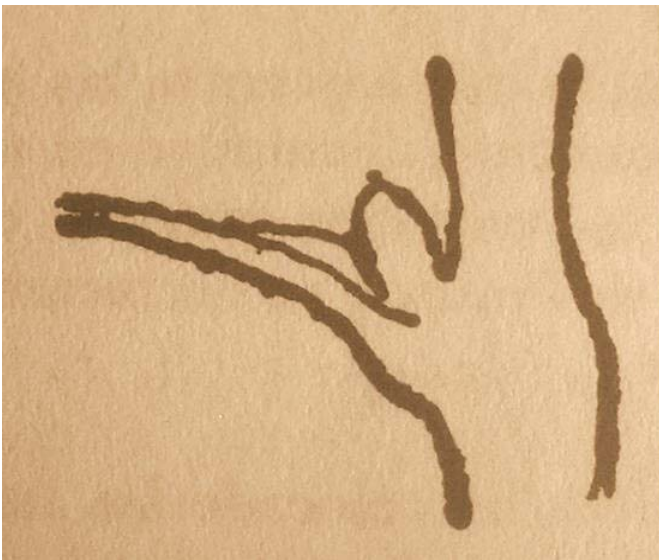


# **Análisis genético del desarrollo de los meristemos axilares**

**Tesis Doctoral**



**José Antonio Aguilar Martínez**



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Biología**

**Análisis genético del desarrollo de los meristemas axilares**

**Tesis Doctoral**

**Madrid, 2007**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Departamento de Biología**

**Análisis genético del desarrollo de los meristemos axilares**

Memoria presentada por JOSE ANTONIO AGUILAR MARTINEZ para optar al grado de Doctor por la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid

Trabajo realizado en el Departamento de Genética Molecular de Plantas del Centro Nacional de Biotecnología - Consejo Superior de Investigaciones Científicas, bajo la dirección de la Doctora Pilar Cubas Domínguez

V.º B.º DE LA DIRECTORA

EL DOCTORANDO

P. Cubas Domínguez

J.A. Aguilar-Martínez



A mis padres

## Agradecimientos

Agradezco a la Doctora Pilar Cubas el haberme dado la oportunidad de realizar la Tesis Doctoral en su laboratorio.

Agradezco a las personas que me han ayudado en la realización de esta Tesis Doctoral del laboratorio, del Departamento de Genética Molecular de Plantas, del Centro Nacional de Biotecnología, de la Universidad Autónoma de Madrid, de otros centros de investigación de Madrid, de España y de otros laboratorios extranjeros.

He disfrutado de una beca predoctoral de formación de personal investigador (FPI) del Ministerio de Educación y Ciencia durante los años 2003-2007

## Summary

Plant branching patterns depend mainly on the control of axillary meristem development. Axillary meristems form at the base of the leaves and form axillary buds that can grow out to generate new shoots or become arrested for long periods of time. This decision depends on endogenous and environmental factors mediated by hormonal signals. Several genes involved in the long-distance signaling of this process have been identified, but genes acting inside the buds to repress its growth remained unknown in the model species *Arabidopsis thaliana*.

We have analyzed the role of two *Arabidopsis* genes encoding TCP transcription factors, *BRANCHED1* (*BRC1*) and *BRANCHED2* (*BRC2*), closely related to *Teosinte branched1* (*Tb1*), a gene which controls axillary bud development in maize (*Zea mays*). *BRC1* and *BRC2* are expressed in developing buds in a dynamic pattern. We show by mutant analysis that *BRC1* has a predominant role in controlling axillary bud development and *BRC2* has a minor role in this process depending on growth conditions. We have carried out double mutant and expression analyses to study the relationships between *BRC1* and other genes controlling branching patterns and have determined that *BRC1* acts downstream of the *MORE AXILLARY GROWTH* (*MAX*) pathway. We have also found that *BRC1* seems to be controlled by this pathway through a posttranscriptional mechanism. We have also shown that *BRC1* transcription is affected by endogenous and external signals, namely auxins and light conditions. Therefore *BRC1* acts inside the buds as an integrator of signals controlling bud outgrowth and translates them into a response of cell growth arrest.

As the response to these signals must be located in regulatory regions within the *BRC1* promoter we have tried to identify important genomic regions responsible for the regulation of *BRC1*. With this aim we have performed an analysis of the *BRC1* promoter. We have found that 1.7 Kb of the *BRC1* gene promoter contains the sequences necessary for axillary bud expression. To further restrict this region we have performed a deletion analysis and a phylogenetic comparison of 5' flanking regions of the *BRC1* gene in several closely related and more phylogenetically distant species. We have identified a 10 pb TGTCTTTCTC motif highly conserved among dicots and TC repeats conserved also in monocots. These sequences are also conserved in more distantly related dicot species. The conservation of *BRC1* function and regulation among distantly related species suggests that a single ancestral mechanism of branching control integration evolved before the radiation of flowering plants. Results obtained in this study have been used as a starting point to perform a one-hybrid screening to look for upstream regulators of *BRC1*.

We have also carried out a promoter analysis of *BRC2* that indicates that the region between -1500 and -1388 from the ATG is necessary for *BRC2* axillary expression.

# Indice

<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1. Arquitectura vegetal y ramificación</b>	<b>3</b>
<b>2. Desarrollo de ramas laterales</b>	<b>3</b>
2.1. Iniciación de meristemos axilares	3
2.2. Formación y desarrollo de yemas axilares	6
<b>3. Dormición de yemas</b>	<b>7</b>
3.1. Endodormición	8
3.2. Ecodormición	8
a) Calidad y cantidad de luz	8
b) Factores nutricionales	9
c) Sequía	9
3.3. Paradormición	9
a) Frutos	9
b) Dominancia apical	9
<b>4. Papel de las hormonas en el control del crecimiento de las yemas</b>	<b>10</b>
4.1. Papel de las auxinas	10
4.2. Papel de las citoquininas	11
4.3. Papel de la ruta MAX	12
4.4. Acción de otras hormonas en el control de la ramificación	13
<b>5. Teosinte branched1 de maíz: genes TCP y control de la ramificación</b>	<b>14</b>
5.1. Patrón de expresión de los genes TCP18 y TCP12	17
 <b>Objetivos</b>	 <b>21</b>
 <b>Materiales y Métodos</b>	 <b>23</b>
<b>1. Materiales</b>	<b>25</b>
1.1. Estirpes bacterianas	25
1.2. Cepas de levadura ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	25
1.3. Material vegetal	25
1.4. Plásmidos	26
1.5. Cebadores	26
1.6. Genotecas y BACs	26
<b>2. Métodos</b>	<b>27</b>
2.1. Cultivos bacterianos	27
2.2. Cultivos de levadura	27
2.3. Cultivo de plantas	27
2.4. Análisis fenotípicos	27
a) Experimento de déficit hídrico	27
b) Ensayo de densidad	28
2.5. Transformación de bacterias	28
a) Transformación de <i>E. coli</i>	28
b) Transformación de <i>A. tumefaciens</i>	28
2.6. Transformación de levadura	28
2.7. Transformación de plantas	28
a) <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
b) <i>Solanum lycopersicum</i>	29
c) <i>Solanum tuberosum</i>	29
d) <i>Nicotiana benthamiana</i>	30
2.8. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos	30
2.9. Amplificación de DNA por PCR	30

2.10. Genotipado de mutantes	30
2.11. Construcción de plásmidos	31
2.12. Secuenciación de DNA	31
2.13. Amplificación de secuencias reguladoras en varios ecotipos de <i>Arabidopsis</i> y especies relacionadas	31
2.14. RT-PCR cuantitativas	31
2.15. Tratamientos con auxinas	32
2.16. Tratamientos con citoquininas	32
2.17. Tratamientos de calidad de luz	32
2.18. Tratamientos de cantidad de luz	32
2.19. Determinaciones cualitativas de $\beta$ -glucuronidasa (GUS)	32
2.20. Detección de la actividad de la proteína fluorescente verde (GFP)	32
2.21. Ensayo de híbrido sencillo	32
2.22. Programas informáticos	33
a) Análisis de secuencias	33
b) Análisis estadísticos	33
<b>Resultados</b>	<b>35</b>
<b>1. Análisis funcional de los genes <i>BRC1</i> y <i>BRC2</i></b>	<b>37</b>
1.1. Las proteínas <i>BRC1</i> y <i>BRC2</i> actúan en el núcleo celular	37
1.2. Exceso de función de <i>BRC1</i> y <i>BRC2</i>	38
1.3. Falta de función de <i>BRC1</i> y <i>BRC2</i>	38
1.4. Regulación cruzada de los genes <i>BRC</i>	40
1.5. Análisis genético de <i>BRC1</i>	41
a) Relación de <i>BRC1</i> con genes de iniciación de meristemos axilares	41
b) Relación de <i>BRC1</i> con la ruta MAX de señalización	43
1.6. Relación de <i>BRC1</i> con hormonas que controlan la ramificación	44
a) Relación de <i>BRC1</i> con la señalización por auxinas	44
b) Relación de <i>BRC1</i> con las citoquininas	46
1.7. Relación de <i>BRC1</i> con estímulos ambientales que suprimen la ramificación	47
a) Relación de <i>BRC1</i> con la respuesta de huida de la sombra	47
b) Relación de <i>BRC1</i> con la respuesta al déficit hídrico	50
<b>2. Análisis del promotor de <i>BRC1</i></b>	<b>52</b>
2.1. Construcción $\Delta^{1.7}$ p <i>BRC1::GUS</i>	52
a) Patrón de expresión	52
b) Respuesta a condiciones que afectan a los niveles de ARNm de <i>BRC1</i>	52
2.2. Análisis de delección del promotor de <i>BRC1</i>	54
2.3. Análisis de la región entre -504 pb y -337 pb en 5' de <i>BRC1</i>	60
2.4. Búsqueda de secuencias conservadas de la región entre -504 pb y -337 pb en 5' de <i>BRC1</i>	61
2.5. Respuesta del promotor de <i>BRC1</i> en Solanáceas	64
2.6. Búsqueda de elementos en <i>trans</i> que se unen al promotor de <i>BRC1</i> : ensayo de híbrido sencillo	66
<b>3. Análisis del promotor de <i>BRC2</i></b>	<b>67</b>
3.1. Patrón de expresión de la construcción $\Delta^{1.7}$ p <i>BRC2::GUS</i>	67
3.2. Análisis de delección del promotor de <i>BRC2</i>	68
3.3. Análisis de la secuencia entre -1500 y -1388 pb del ATG de <i>BRC2</i>	68
<b>Discusión</b>	<b>71</b>
<b>1. Función de <i>BRC1</i> en el control de la ramificación</b>	<b>73</b>
<b>2. Interacción de <i>BRC1</i> con genes de iniciación de meristemos axilares</b>	<b>74</b>
<b>3. Relación de <i>BRC1</i> con la señalización hormonal</b>	<b>75</b>

3.1. Auxinas	75
3.2. Citoquininas	75
3.3. Análisis de la secuencia entre -1500 y -1388 pb del ATG de <i>BRC2</i>	76
<b>4. Relación de <i>BRC1</i> con los estímulos luminosos e hídricos</b>	<b>77</b>
<b>5. <i>BRC1</i> como integrador de señales de control de la ramificación</b>	<b>78</b>
<b>6. Regulación transcripcional</b>	<b>78</b>
<b>7. Regulación post-transcripcional</b>	<b>83</b>
<b>8. Modelo de acción de <i>BRC1</i></b>	<b>84</b>
<b>9. Conservación de la función de <i>BRC1</i> en angiospermas</b>	<b>85</b>
 <b>Conclusiones</b>	 <b>89</b>
 <b>Bibliografía</b>	 <b>93</b>
 <b>Anexo I</b>	 <b>107</b>
<b>Anexo II</b>	<b>115</b>

## Abreviaturas y siglas

3-AT	3-amino-1,2,4-triazol
aas	aminoácidos
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AHP	<i>Arabidopsis histidine phosphotransfer protein</i>
Amp	Ampicilina
ARE	<i>AU-rich Elements</i>
ARF	<i>Auxin Responsive Factor</i>
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ATA	<i>Auxin Transport Autoinhibition</i>
ATP	adenosín trifosfato
AUF1	<i>A+U-rich RNA binding factor</i>
AUX/IAA	<i>auxin/indol-3-acetic acid proteins</i>
AuxRe	<i>Auxin responsive element</i>
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
BBR/BPC	<i>barley b recombinant/basic pentacysteine</i>
bHLH	<i>basic Helix-Loop-Helix</i>
BY2	<i>Bright Yellow -2</i>
bZIP	<i>basic region/leucine zipper motif</i>
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>
CARG-box	<i>CC-A-rich-GG-box</i>
CNB-CSIC	Centro Nacional de Biotecnología-Consejo Superior de Investigaciones Científicas
com. pers.	comunicación personal
cont.	continuación
cv.	cultivar
DDT	<i>DNA binding homeobox and Different Transcription factors</i>
DO <sub>600</sub>	densidad óptica a 600nm
DOF	<i>DNA-binding with one finger</i>
Ej.	ejemplo
EMS	Etilmetanosulfonato
Fig.	Figura
GA <sub>3</sub>	ácido giberélico
Gent	Gentamicina
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GM	<i>Growth Media</i>
GRAS	<i>GAI, RGA, SCR</i>
GUS	β-Glucuronidasa
his	histidina
HMG	<i>high-mobility-group</i>
Hygr	Higromicina
IAA	ácido indolacético
Kan	Kanamicina
Kb	Kilobase
LB	Luria-Bertani
LiAc	Acetato de litio
LRR	<i>Leucin-Reach-Repeat</i>

Lys	Lisina
m.a.	millones de años
Mb	Megabase
MCS	<i>Multicloning site</i>
MES	<i>2(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i>
MS	Murashige & Skoog
MYB	<i>myeloblastosis oncogene</i>
n	número de individuos
NAA	ácido 1-naftalenacético
NaAc	Acetato sódico
NAC	<i>NAM, ATAF1,2, CUC2</i>
NaCl	Cloruro sódico
NBS-LRR	<i>Nucleotide Binding Site-Leucine-Rich Repeat</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NPA	Acido naftilftalámico
O/N	<i>Overnight</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
p/v	peso/volumen
pb	pares de bases
PcG	<i>Polycomb Group</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR2	<i>Polycomb Repressive Complex2</i>
PHD	<i>plant homeodomain finger</i>
RbCl	Cloruro de rubidio
R:RL	razón luz roja:luz roja lejana
RNAi	<i>RNA interference</i>
rpm	revoluciones por minuto
SCF	<i>Skip1, Cul-1, F-box</i>
ssp.	subespecie
Sptc	Espectinomicina
SWI/SNF	<i>Switch/Sucrose Nonfermenting</i>
TCP	<i>Teosinte branched1-Cycloidea-PCF</i>
TIBA	Acido triyodobenzóico
ura	uracilo
UTR	<i>Untranslated Region</i>
UV	ultravioleta
v/v	volumen/volumen
VP16	<i>Herpes simplex virion protein 16</i>
YSD	<i>Yeast Synthetic medium with Dextrose</i>
YPAD	<i>Yeast extract Peptone Adenine Dextrose</i>

Las abreviaturas de medidas son las aceptadas por el Sistema Internacional de Unidades y Medidas

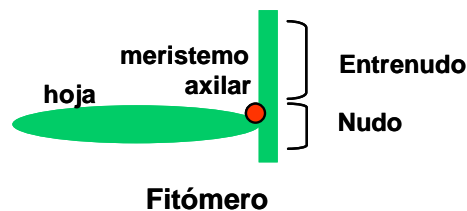


# Introducción

## 1. Arquitectura vegetal y ramificación

En las plantas con semillas, durante la embriogénesis, se establece el eje primario de crecimiento apical-basal, generado por dos grupos de células proliferantes, los meristemos apicales del tallo y de la raíz. Durante el desarrollo postembrionario, el meristemo apical del tallo produce de forma repetitiva módulos (fitómeros) formados por un nudo, con un órgano lateral y un meristemo axilar, y por un entrenudo (Fig. 1). Variaciones en los patrones de desarrollo de cada uno de estos elementos dan lugar a la gran diversidad morfológica de las plantas.

Los meristemos axilares pueden ser vegetativos, que dan lugar a ramas y crecen de forma similar al eje primario o principal, o reproductivos, que dan lugar a inflorescencias y flores (Evans y Barton, 1997). En nuestro grupo estamos estudiando el desarrollo de los meristemos axilares vegetativos. Este desarrollo está afectado por condiciones ambientales y endógenas de la planta y está genéticamente controlado en cada especie. El programa de desarrollo que especifica el patrón de ramificación es de fundamental importancia en la determinación de la arquitectura de las plantas.



**Figura 1.** El fitómero es la estructura básica de la parte aérea de las plantas y está formado por un nudo (con una hoja y un meristemo axilar, círculo rojo) y un entrenudo.

## 2. Desarrollo de ramas laterales

El programa de desarrollo de una rama lateral se puede dividir en tres estadios: iniciación de un nuevo meristemo en la axila de la hoja, desarrollo de este meristemo hasta formar una yema axilar y elongación de la rama. Estas dos últimas etapas pueden transcurrir sin interrupción o detenerse durante largos períodos de tiempo, dependiendo de las condiciones ambientales y endógenas en las que crece la planta.

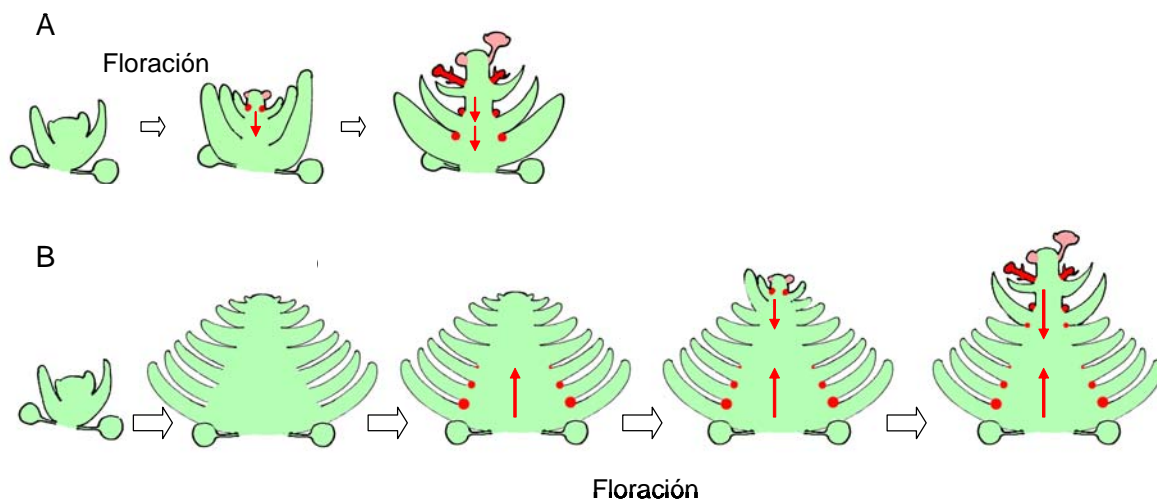
### 2.1. Iniciación de meristemos axilares

Los meristemos axilares se forman en la zona adaxial de los órganos laterales. En algunas especies los meristemos axilares se detectan muy temprano en la periferia del meristemo apical del tallo, en las axilas de los primordios de hoja que se están formando. Este es el caso de algunas Solanáceas, por ejemplo patata o tomate. Sin embargo en otras especies los meristemos axilares se desarrollan en órganos ya diferenciados y alejados del meristemo apical. Este es el caso de especies como *Arabidopsis thaliana*.

Para tratar de explicar cómo se originan los meristemos axilares (que tienen la misma organización que el meristemo apical pero se forman en un contexto de desarrollo totalmente diferente) se han planteado dos hipótesis: una propone que los meristemos axilares provienen directamente de células del meristemo apical (hipótesis o modelo de meristemos desgajados o *detached meristems*, Garrison, 1955; Steeves y Sussex, 1989; Long y Barton, 2000). La otra propone que un grupo de células, total o parcialmente

diferenciadas de la zona axilar de las hojas, sufre un proceso de desdiferenciación que lleva a la formación de células meristemáticas (hipótesis de formación *de novo* o *de novo formation*, Snow y Snow, 1942; Garrison, 1955; McConnell y Barton, 1995). Más recientemente, el estudio de genes implicados en la formación de meristemos axilares ha permitido elaborar un tercer modelo que propone que en la zona axilar de las hojas existe una zona de células no diferenciadas con competencia para expresar genes de meristemo y, eventualmente, formar meristemos axilares (Schmitz y Theres, 2005; McSteen y Leyser, 2005).

En especies como *A. thaliana*, en las que la iniciación de meristemos ocurre en hojas ya desarrolladas, este proceso no ocurre simultáneamente en todos los nodos de la planta. En *Arabidopsis*, en condiciones de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad), el meristemo apical del tallo produce una roseta de 12 a 16 hojas y luego empieza a producir meristemos florales. Inmediatamente después de la transición floral empiezan a formarse meristemos axilares en sentido basipétalo, primero en las axilas de las hojas más cercanas al ápice, y más tarde en hojas más alejadas (Fig. 2A). Sin embargo en condiciones de día corto (8 h de luz y 16 h de oscuridad) la fase vegetativa es mucho más prolongada que en día largo y las plantas producen muchas más hojas de roseta antes de la floración. En este caso, se forman meristemos en patrón acropétalo, primero en las hojas de roseta más basales y posteriormente en hojas más cercanas al ápice. Después de la transición floral, se inicia el patrón basipétalo descrito más arriba (Fig. 2B; Hempel y Feldman, 1994; Long y Barton, 2000; Grbić y Bleecker, 2000).



**Figura 2.** Iniciación de meristemos axilares dependiente de fotoperíodo en *Arabidopsis thaliana*. **A)** En día largo los meristemos (puntos rojos) se inician según una ola basipétala (flechas rojas). **B)** En día corto la formación es primero basipétala y posteriormente también acropétala. Según Grbić y Bleecker (2000) y Long y Barton (2000).

El análisis genético en *Arabidopsis* y otras especies ha permitido identificar genes que tienen un papel central en la iniciación de meristemos axilares. El gen *LATERAL SUPPRESSOR* (*LAS*) de *Arabidopsis* tiene un papel fundamental en el mantenimiento de una región axilar con capacidad de formación de meristemos en la base de las hojas. En los mutantes *las*, durante el desarrollo vegetativo no se forman meristemos axilares en las

hojas de roseta y por tanto tampoco ramas de roseta. Asimismo tras la floración no se suelen formar ramas caulinares secundarias (Greb *et al.*, 2003). Su homólogo en tomate es *Lateral suppressor* (*Ls*). Las plantas de tomate mutadas en este gen tampoco forman meristemas en las axilas de las hojas durante la fase vegetativa de crecimiento y además tienen afectado el desarrollo de las flores (Schumacher *et al.*, 1999). El gen homólogo en arroz es *MONOCULM1* (*MOC1*), cuyas mutaciones presentan fenotipos similares a los de *las* (Li *et al.*, 2003). La sobreexpresión de *MOC1* produce plantas más ramificadas y de menor estatura que las silvestres, lo que indica que *MOC1* también actúa promoviendo la iniciación y desarrollo de los meristemas axilares (Li *et al.*, 2003).

*LAS/Ls/MOC1* codifican para proteínas de la subfamilia VHIID de factores de transcripción GRAS (Schumacher *et al.*, 1999). En hojas muy jóvenes, el ARNm de *LAS* se acumula en un dominio en forma de banda en la base de la parte adaxial foliar. En hojas más desarrolladas la expresión de *LAS* desaparece en una pequeña zona oval en el centro de su dominio de expresión, que coincide con la posición donde se formará el meristemo axilar. De forma simultánea a esta regulación negativa de *LAS*, en esa misma región se observa entonces la acumulación de *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*), un gen necesario para el establecimiento y mantenimiento de los meristemas (Barton y Poethig, 1993; Greb *et al.*, 2003). Sin embargo en las axilas de las hojas del mutante *las* no se observa esta expresión focalizada de *STM*, lo que sugiere que la expresión de *STM*, necesaria para la organización del meristemo axilar, depende de la función de *LAS*. Por tanto, *LAS* parece necesario para impedir la diferenciación de esta zona adaxial competente para la formación de meristemas axilares (Greb *et al.*, 2003).

En otro mutante aislado en tomate, *blind* (*bl*) o *torosa-2* (*to-2*), se producen menos meristemas axilares y ramas tanto en la fase vegetativa como en la reproductiva, y además la mutación afecta al desarrollo de las flores (Schmitz *et al.*, 2002). *Blind* codifica para un factor de transcripción tipo MYB. En Arabidopsis el homólogo de *Blind* es *AtMYB37* o *REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS1* (*RAX1*, Keller *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2006). El mutante *rax1* produce menos meristemas axilares y menos ramas que las plantas silvestres. *RAX1* actúa en los estadios iniciales de la formación de los meristemas axilares y se expresa en la misma región que *LAS* pero en un dominio central más reducido. *RAX1* especifica un nicho de células madre para la formación del meristemo axilar. Cercanos filogenéticamente a *RAX1* están *RAX2* (*AtMYB38*) y *RAX3* (*AtMYB84*, Keller *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 2006). *rax2* o *rax3* no tienen fenotipo mutante, pero intensifican el fenotipo de *rax1* en los dobles mutantes con éste. Los dobles mutantes *rax2 rax3* también tienen menos meristemas axilares en las hojas de roseta. El triple mutante *rax1 rax2 rax3* apenas produce meristemas en las hojas de roseta, y produce pocos en las caulinares (Muller *et al.*, 2006). Estos fenotipos son dependientes de fotoperíodo, de forma que se aprecian en día corto pero mucho menos en día largo (Muller *et al.*, 2006).

*LAS* y los genes *RAX* parecen actuar en rutas distintas durante la formación de los meristemas axilares ya que el patrón de expresión de *LAS* no está alterado en *rax1*, ni el de *RAX1* en *las*. Además el fenotipo de los dobles mutantes *las rax1* en Arabidopsis o *ls bl* en tomate parece ser aditivo (Schmitz *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2006; Keller *et al.*, 2006).

En el mutante de *Arabidopsis revoluta* (*rev*), *interfascicular fiberless1* (*ifl1*), o *amphivasal vascular bundle 1* (*avb1*), la producción de meristemos laterales también está reducida (Talbert *et al.*, 1995; Zhong y Ye, 1999; Zhong *et al.*, 1999; Otsuga *et al.*, 2001; Zhong y Ye, 2001; Zhong y Ye, 2004). Las axilas de las hojas suelen estar vacías, y en las que no lo están a veces se desarrollan estructuras foliares o filamentosas en lugar de yemas normales. Este mutante también afecta al desarrollo del tejido vascular y al desarrollo de las flores. *REV/IFL1* se expresa en la zona adaxial de las axilas de las hojas y también en el tejido vascular de las hojas en desarrollo, en el meristemo apical del tallo, en primordios florales y en flores en desarrollo. *REV/IFL1* codifica para un factor de transcripción del grupo HD-Zip III (Otsuga *et al.*, 2001).

Durante la formación de los meristemos axilares se requiere la función de *LAS* para que actúe *IFL1*, ya que en mutantes *las* no se detecta expresión de *IFL1* en la zona donde aparecerán los meristemos axilares, aunque sí hay expresión de *IFL1* en otros tejidos como el meristemo apical del tallo o los elementos vasculares de los primordios foliares (Greb *et al.*, 2003).

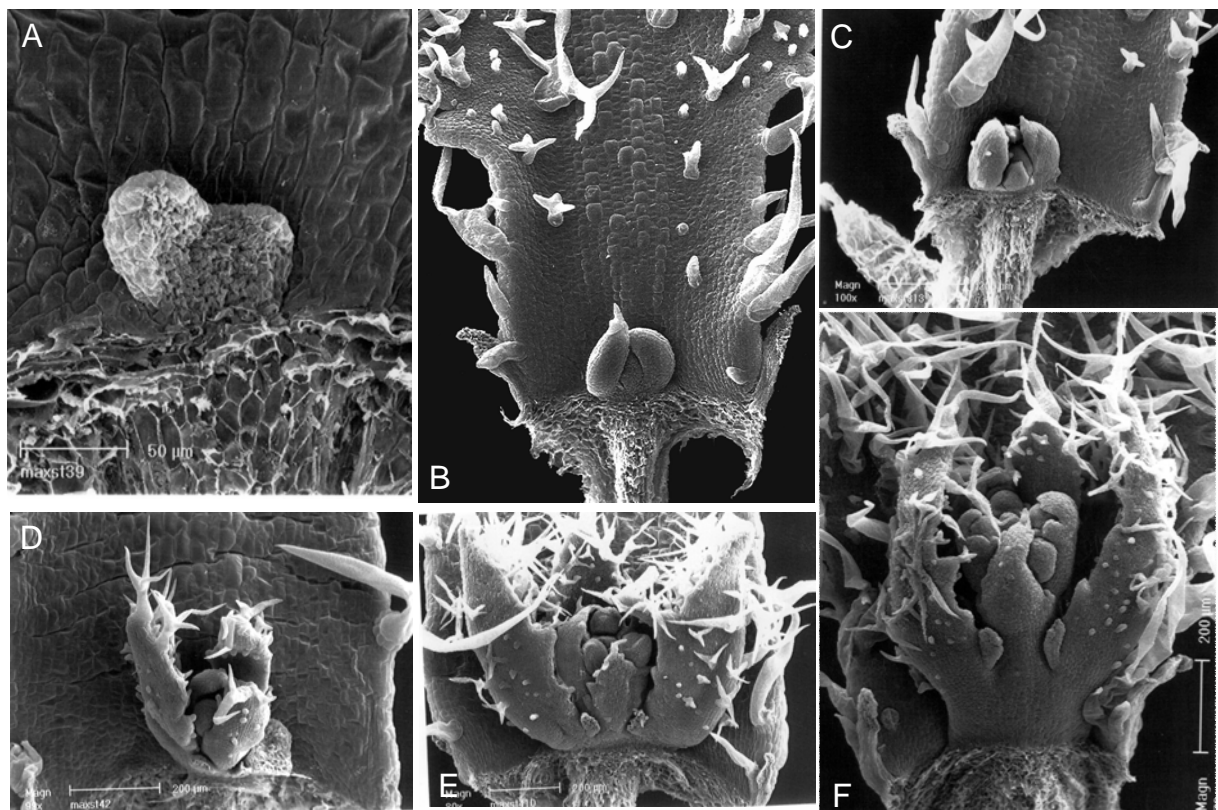
Las mutaciones en genes necesarios para la actividad del meristemo apical del tallo afectan a la formación de todos los meristemos, incluidos los axilares, ya que todos ellos tienen estructura y funcionamiento semejantes. Sin embargo estos mutantes presentan fenotipos más pleiotrópicos que los descritos hasta ahora. De entre estos genes los que tienen un papel más relevante en la formación de meristemos axilares en *Arabidopsis* son los genes *CUP-SHAPED COTYLEDON*, *CUC2* y *CUC3*, que junto con *CUC1* actúan de forma redundante regulando la formación del meristemo apical del tallo y la especificación de la región entre cotiledones durante el desarrollo embrionario (Takada *et al.*, 2001; Vroemen *et al.*, 2003). Los genes *CUC* codifican para factores de transcripción NAC (Takada *et al.*, 2001). Los mutantes *cuc3* tienen menos ramas que las plantas silvestres y en los dobles mutantes *cuc2 cuc3* este fenotipo se intensifica, mientras que en los mutantes *cuc1* o sus combinaciones no se observan estos fenotipos (Hibara *et al.*, 2006). Los genes *CUC* y *LAS* tienen un patrón de expresión similar durante el desarrollo (Hibara *et al.*, 2006). Durante la embriogénesis, *LAS* se expresa en la región intercotiledonar donde se formará el meristemo apical del tallo, como los genes *CUC1* y *CUC2*. En dobles mutantes *cuc1 cuc2* no se detecta esta expresión embrionaria de *LAS*, lo que sugiere que *CUC1* y *CUC2* podrían ser reguladores de *LAS* (Hibara *et al.*, 2006). Por otro lado, *RAX1* interacciona con *CUC2*, ya que en el mutante *rax1* no se detecta expresión de *CUC2* en la zona donde se formarán los meristemos axilares (Keller *et al.*, 2006).

### 2.2. Formación y desarrollo de yemas axilares

Los meristemos axilares tienen características estructurales y funcionales similares a las del meristemo apical y expresan genes marcadores típicos de meristemo como *STM* (Grbic y Bleecker, 2000; Long y Barton, 2000), *CLAVATA3* (*CLV3*, Brand *et al.*, 2002) o *WUSCHEL* (*WUS*, Keller *et al.*, 2006). Sin embargo la expresión de estos genes no parece ser suficiente para el establecimiento de los meristemos axilares. Así, en el ecotipo *Zu-0* de *Arabidopsis*, caracterizado por ser poco ramificado, *STM* se expresa correctamente en las axilas de las hojas pero los meristemos no se establecen ni se desarrollan (Kalinina *et al.*, 2002).

En plantas silvestres, una vez iniciado el meristemo axilar, éste empieza a producir primordios de órganos laterales u hojas. La estructura axilar formada por este meristemo y por varios primordios de hoja e incluso, en algunos casos, por meristemos florales, se denomina yema axilar o lateral.

En nuestro laboratorio hemos distinguido una serie de fases o estadios en la formación y desarrollo de las yemas axilares (Fig. 3). El estadio de primordio de hoja define a yemas axilares formadas sólo por dos primordios de hoja (Fig. 3A). En el estadio vegetativo 1 las yemas tienen varios primordios de hoja sin tricomas (Fig. 3B). En el estadio vegetativo 2 los primordios de hoja presentan tricomas y las yemas tienen un tamaño menor de 400µm (Fig. 3C). El estadio vegetativo 3 es un estadio vegetativo tardío, con primordios de hoja expandiéndose y yemas mayores de 400µm (Fig. 3D). El estadio reproductivo corresponde a una yema en la que se observan meristemos florales (Fig. 3E). Posteriormente esta yema puede elongar dando lugar a una rama lateral (Fig. 3F).



**Figura 3.** Estadios de desarrollo de las yemas axilares. A) Primordio de hoja. B) Estadio vegetativo 1. C) Estadio vegetativo 2. D) Estadio vegetativo 3. E) Estadio reproductivo. F) Yema axilar que empieza a elongar.

### 3. Dormición de yemas

Una vez formadas las yemas axilares, estas pueden elongar inmediatamente dando lugar a una rama lateral. Sin embargo es frecuente que las yemas no elonguen de forma inmediata sino que permanezcan inhibidas, en un estado que se denomina dormición y que se define como la suspensión temporal del crecimiento (Lang *et al.*, 1987). Hay varios tipos de dormición definidos según los factores que la promueven: endodormición, si está regulada por factores fisiológicos del interior de la yema; ecodormición, cuando está

regulada por factores ambientales; y paradormición, si está regulada por factores fisiológicos externos a la yema.

### 3.1. Endodormición

La endodormición está controlada por factores intrínsecos a la yema. Es el resultado de cambios fisiológicos internos en las yemas que impiden su brotación aún cuando las condiciones ambientales son favorables. La endodormición se observa principalmente en yemas de especies herbáceas o leñosas plurianuales, en las que las yemas sirven como estructuras de supervivencia. Temperatura y fotoperíodo son los factores inductores de la endodormición. Antes de entrar en endodormición las yemas pasan por un período de aclimatación, que se inicia cuando las plantas perciben primero la variación en el fotoperíodo y posteriormente las temperaturas cada vez menores. Para salir de la endodormición las yemas deben pasar un cierto período de exposición al frío o *vernalización* (Gil-Albert, 1998).

### 3.2. Ecodormición

La ecodormición es una dormición de las yemas impuesta por factores ambientales. Puede interrumpirse si dichos factores cambian.

#### a) Calidad y cantidad de luz

Clásicamente se conoce el hecho de que las plantas crecidas a altas densidades producen menos ramas laterales. Muchos trabajos agronómicos han estudiado este aspecto sobre todo en relación a su efecto en el rendimiento, por ejemplo en cereales (Evers *et al.*, 2006), plantas forrajeras (Casal *et al.*, 1990), textiles (Reta-Sanchez y Fowler, 2002) u ornamentales (Skalova y Krahulec, 1992). También lo demuestran estudios en especies silvestres (Barišić *et al.*, 2006). *Arabidopsis* también presenta esta respuesta de menor producción de ramas al crecer a altas densidades de plantación (Dorn *et al.*, 2000).

Uno de los factores ambientales limitantes para el desarrollo de las plantas que crecen a altas densidades, en ambientes naturales o en cultivo, es la disponibilidad de luz. En estas condiciones, la radiación fotosintéticamente activa (*PAR*, *Photosynthetically Active Radiation*) necesaria para realizar la fotosíntesis está reducida. Las plantas detectan la presencia de otras plantas en las proximidades que pueden reducir su exposición a la luz mediante la detección de la razón luz roja-luz roja lejana (*R:RL*). En presencia de otras plantas esta razón disminuye por la absorción de la radiación roja por los pigmentos fotosintéticos de las hojas (Smith y Whitelam, 1997; Aphalo *et al.*, 1999). Los niveles reducidos de *R:RL* desencadenan un mecanismo o síndrome conocido como huída o intolerancia a la sombra (*shade avoidance*), por el que las plantas inician una serie de respuestas de desarrollo para mantenerse expuestas a la luz. Entre estas respuestas se encuentran la inhibición de su ramificación lateral, la elongación de entrenudos para alcanzar mayor altura, el alargamiento de los pecíolos, la orientación de las hojas hacia arriba (hiponastia) y la floración temprana. El principal sensor usado por las plantas para captar los cambios en el ratio *R:RL* es el fitocromo B (*PHYTOCHROME B*, *PHYB*; Whitelam y Smith, 1991; Halliday *et al.*, 1994), mientras que el fitocromo A (*PHYTOCHROME A*, *PHYA*; antagoniza su acción (Cerdán *et al.*, 1999).

Además de la calidad de la luz percibida, la intensidad de luz también afecta a la ramificación. Una menor cantidad de luz reduce la ramificación, como se ha descrito en

campanilla (*Ipomoea nil*, Hosokawa *et al.*, 1990), en *Coleus* (Cline, 1996) o en gramíneas (White y Mansfield, 1978; Casal *et al.*, 1986; Gautier *et al.*, 1999).

#### **b) Factores nutricionales**

En general las plantas que crecen sin limitaciones nutricionales pueden desarrollar todo su potencial para producir semillas. Gran parte de ese potencial depende del desarrollo de las yemas axilares que dan lugar a ramas y flores.

En *Arabidopsis* un mayor aporte de nutrientes se refleja en un mayor grado de ramificación (Bonser y Aarssen, 2001). En ciertas especies como por ejemplo judía (McIntyre y Cessna, 1991), girasol (Steer y Hocking, 1983), melocotonero (Médiène *et al.*, 2002) o en las Brasicáceas *Thlaspi arvense* (Benner, 1988) o *Erysimum strictum* (Piipo *et al.*, 2005), el suplemento de nitrógeno favorece la brotación de las yemas axilares inhibidas.

Por otra parte hay estudios que señalan al boro (un micronutriente esencial) como otro factor relacionado con la ramificación en plantas: las plantas deficientes en boro producen más ramas. Sin embargo este efecto es posiblemente una consecuencia indirecta de que la carencia de boro causa un arresto del crecimiento del meristemo apical del tallo (Marschner, 1995) y una reducción del transporte de auxinas (Jiao *et al.*, 2007).

#### **c) Sequía**

Se ha observado que las plantas sometidas a estrés hídrico producen menos ramas que las crecidas con un aporte adecuado de agua. Esto es debido a que en condiciones de sequía el meristemo apical actúa como sumidero principal de agua y nutrientes, y sobre todo porque los procesos de elongación celular son inhibidos en estas condiciones de estrés (McIntyre, 1987; Busso *et al.*, 1987; Busso y Richards, 1995; Eneboe *et al.*, 2002; Baczeck-Kwinta *et al.*, 2006).

### **3.3. Paradormición**

Resulta de la inhibición de las yemas axilares ejercida por otras partes de la planta, como los frutos o un ápice en crecimiento. También se la conoce como *inhibición correlativa*.

#### **a) Frutos**

En algunas especies los frutos ejercen un control negativo sobre el desarrollo de las yemas axilares. Por ejemplo en ciertas variedades de judía verde la eliminación de los frutos provoca el crecimiento de las yemas inhibidas (Tamas *et al.*, 1979; Tamas *et al.*, 1981). Este efecto parece estar mediado por auxinas, de las que las semillas son productoras (Bandurski y Schulze, 1977). De igual forma el desarrollo de los frutos controla la ramificación en *Arabidopsis* (Hensel *et al.*, 1994). Esto explicaría la observación general de que los mutantes con fertilidad reducida suelen presentar un aspecto más arbustivo.

#### **b) Dominancia apical**

Es un mecanismo o fenómeno según el cual la yema apical inhibe el desarrollo de las yemas axilares. Si la yema apical es dañada o eliminada por acción de herbívoros o por poda, o su crecimiento se detiene por enfermedad, las yemas axilares pueden activarse y empezar a elongar hasta que una actúe de nuevo como dominante, inhibiendo al resto. Todos los sistemas de manejo de cultivos y plantas por poda se basan en el fenómeno de la dominancia apical.

No todas las plantas exhiben el mismo grado de dominancia apical. En el girasol, por ejemplo, la dominancia apical es absoluta, ya que ninguna yema axilar se desarrolla (Sitte



*et al.*, 1994). En *Arabidopsis* sin embargo la dominancia apical no es muy pronunciada y las ramas próximas a la inflorescencia principal siempre se desarrollan (Cline, 1991).

### 4. Papel de las hormonas en el control del crecimiento de las yemas

#### 4.1. Papel de las auxinas

Al decapitar una planta y eliminar su yema apical, algunas de sus yemas axilares empiezan a elongar. Si tras la decapitación se aplican auxinas a la zona decapitada, las yemas no se desarrollan. Esto sólo ocurre al aplicar auxinas pero no otras hormonas. Esto parece indicar que las auxinas median el control de la dominancia apical, como demostraron por primera vez Thimann y Skoog en ensayos de decapitación de plántulas de *Vicia faba* (Thimann y Skoog, 1933).

Mutantes que afectan al metabolismo o acción de las auxinas tienen frecuentemente patrones de ramificación alterados. En *Arabidopsis*, la mutación dominante *yucca1* (*ycc1*), que tiene un contenido de auxinas libres mayor que en las plantas silvestres, produce un fenotipo de elevada dominancia apical, además de hypocotilos largos, y hojas epinásticas y más estrechas (Zhao *et al.*, 2001). *YCC1* codifica para una flavín monooxigenasa que forma parte de la ruta dependiente de triptófano en la síntesis de auxinas (Zhao *et al.*, 2001). La sobreexpresión en *Arabidopsis* de otras enzimas endógenas implicadas en la síntesis de auxinas o de enzimas de *Agrobacterium tumefaciens* como *iaaM* o *iaaH*, eleva los niveles de auxinas y también producen plantas muy poco ramificadas (Graaff *et al.*, 2003, Sitbon *et al.*, 1992).

Los mutantes como *auxin resistant1* (*axr1*), que presentan una sensibilidad reducida a auxinas, tienen menor dominancia apical que las plantas silvestres (Stirnberg *et al.*, 1999; Chatfield *et al.*, 2000). *AXR1* codifica para un componente necesario para la ubiquitinación de proteínas (Leyser *et al.*, 1993). Por otra parte los mutantes de ganancia de función *iaa28-1*, que sobreexpresan *IAA28*, un gen que codifica para un factor negativo de respuesta a auxinas (Kim *et al.*, 1997), son plantas pequeñas más ramificadas que las silvestres (Rogg *et al.*, 2001). Los mutantes en otro gen, *MONOPTEROS* (*MP*), que codifica para ARF5, un factor de transcripción que se une a elementos de respuesta a auxina y es un regulador positivo de la expresión génica inducida por auxinas (Guilfoyle *et al.*, 1998), presentan menos meristemas axilares, además de otros defectos en la raíz embrionaria, en la correcta producción del sistema vascular y producen plantas con pocas flores (Przemeck *et al.*, 1996; Vidaurre *et al.*, 2007).

El transporte de auxinas parece jugar un papel en el control del desarrollo axilar. En tallos decapitados cesa el transporte polar de auxinas (Morris y Johnson, 1990). Si se trata el ápice intacto de una planta con inhibidores del transporte de auxinas como TIBA o NPA el efecto producido es similar al de la decapitación (Sorrels *et al.*, 1978). Según el modelo ATA (*Auxin Transport Autoinhibition*), en plantas intactas el transporte basipétalo de auxinas en el tallo principal inhibe el transporte de las auxinas producidas en las yemas, y puesto que este transporte es necesario para el desarrollo de las yemas, estas permanecen inhibidas (Bangerth *et al.*, 2000). Al decapitar las plantas, el transporte principal de auxinas cesa y las yemas laterales pueden conectar su flujo de auxinas al principal del tallo y desarrollarse. Mutaciones como *pinformed1* (*pin1*) o *pinoid* (*pid*)

afectan al transporte polar de auxinas y presentan fenotipos pleiotrópicos similares, entre los que se incluye la formación de un menor número de meristemos axilares. *PINFORMED1* (*PIN1*) es una proteína transmembrana que actúa como transportador de eflujo de auxinas (Gällweiler *et al.*, 1998). Los mutantes *pin1* no afectan a la estructura del meristemo apical del tallo pero sí a la iniciación de órganos laterales, flores y meristemos axilares (Vernoux *et al.*, 2000). *PINOID* codifica para una proteína serina/treonina quinasa que está presente principalmente en el tejido vascular de órganos en desarrollo y actúa como un activador del transporte polar de auxinas (Christensen *et al.*, 2000; Benjamins *et al.*, 2001). *PID* controla la actividad de *PIN1* en *Arabidopsis* (Friml *et al.*, 2004) y las líneas 35S::*PID* producen más ramas que las silvestres (Benjamins *et al.*, 2001).

Sin embargo el efecto de las auxinas en el control de la ramificación parece ser indirecto. Las auxinas se sintetizan en gran cantidad en los primordios de hoja del ápice (Ljung *et al.*, 2001) y se transportan de forma basipétala (Blakeslee *et al.*, 2005), pero no actúan directamente en las yemas ya que no entran en ellas (Hillman *et al.*, 1977; Prasad *et al.*, 1993). Además, la aplicación directa de auxinas en las yemas no inhibe su crecimiento (Sachs y Thimann, 1967; Hillman *et al.*, 1977; Brown *et al.*, 1979; Tamas *et al.*, 1981). Por otro lado se ha observado que tras la decapitación, el nivel de auxinas en las yemas axilares aumenta ya que las yemas se transforman a su vez en fuente de auxinas (Thomas, 1972; Jablanovic y Neskovic, 1977; Gocal *et al.*, 1991). Esto parece indicar que tiene que haber otro regulador distinto a las auxinas y que actúe directamente dentro de las yemas (Osborne, 1967).

#### **4.2. Papel de las citoquininas**

Este segundo regulador que actúa directamente en las yemas podría tratarse de las citoquininas, que tienen una acción opuesta a la de las auxinas, ya que actúan promoviendo el desarrollo axilar. Las citoquininas se sintetizan en las raíces y en el tallo (Chen *et al.*, 1985; Nordström *et al.*, 2004) y pueden entrar en las yemas (Sachs y Thimann, 1967; Miguel *et al.*, 1998).

Se ha observado que las plantas con elevados niveles de citoquininas desarrollan más meristemos axilares y producen más ramas. Así, los mutantes de *Arabidopsis* *altered meristem program1* (*amp1*), cuyo contenido en citoquininas es cinco veces superior al de las plantas silvestres, presentan un fenotipo muy ramificado, además de otras alteraciones en el desarrollo, por sobreproducción y crecimiento de meristemos axilares (Chaudhury *et al.*, 1993; Nogué *et al.*, 2000). *AMP1* codifica para una glutamato carboxipeptidasa y se expresa de forma ubicua (Helliwell *et al.*, 2001). De forma similar a *amp1* se comporta el mutante de *Arabidopsis* *hoc* (*high shoot-organogenic capacity*), en el que los niveles de citoquininas también son más elevados. Estas plantas también tienen más ramas que las plantas silvestres (Catterou *et al.*, 2002). El mutante *supershoot* (*sps*) o *bushy-1* (*bus-1*) de *Arabidopsis* tiene niveles elevados de citoquininas, aunque también mayor cantidad de auxinas (Reintanz *et al.*, 2001; Tantikanjana *et al.*, 2001). *SPS* codifica para el citocromo P450 *CYP79F1* y actúa en la formación de glucosinolatos alifáticos (Hansen *et al.*, 2001; Reintanz *et al.*, 2001). *sps* se caracteriza por una sobreproducción de meristemos axilares y por la desrepresión de las yemas axilares, de forma que las plantas son más ramificadas que las silvestres (Tantikanjana *et al.*, 2001; Reintanz *et al.*, 2001). Estos mutantes tienen

además las hojas con el margen serrado y con más contenido en clorofila, fertilidad reducida y senescencia retrasada.

Las plantas de *Arabidopsis* con falta de función en *AtMYB2*, un gen que se expresa de forma tardía en la base de las hojas de la roseta e inhibe genes de síntesis de citoquininas, también presentan niveles muy altos de citoquininas y, asociado a esto, un número muy elevado de ramas laterales (Guo y Gan, 2007).

Asimismo plantas que sobreexpresan genes de la ruta de biosíntesis de citoquininas como *Shooting (Sho)* de petunia, una línea de ganancia de función en un gen que codifica para una isopentenil transferasa, tienen dominancia apical reducida y mayor capacidad organogénica para formar tallos (Zubko *et al.*, 2002).

Además, existen interacciones entre las auxinas y las citoquininas. Las auxinas reducen la cantidad de citoquininas en el xilema (Bangerth, 1994; Nordström *et al.*, 2004) e inhiben su síntesis en las yemas (Bredmose *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2006).

### 4.3. Papel de la ruta MAX

Recientemente se ha caracterizado molecularmente otra ruta de señalización a distancia que inhibe el crecimiento de las ramas laterales y de la que sería responsable una nueva hormona aún no caracterizada. Hasta el momento algunos de los genes implicados se han identificado en *Arabidopsis*, guisante, petunia y arroz (Napoli *et al.* 1999; Stirnberg *et al.*, 2002; Sorefan *et al.*, 2003; Napoli, 1996; Zou *et al.*, 2006). En *Arabidopsis* estos genes se han denominado MAX (*MORE AXILLARY GROWTH*) y hasta ahora se han clonado 4: MAX1, MAX2, MAX3 y MAX4. Los homólogos de MAX2 son *RAMOSUS 4 (RMS4)* en guisante (Johnson *et al.*, 2006) y *DWARF3 (D3)* en arroz (Ishikawa *et al.*, 2005). Los homólogos a MAX3 son *RMS5* en guisante (Johnson *et al.*, 2006) y *HIGH-TILLERING DWARF1 (HTD1)* en arroz (Zou *et al.*, 2006). Los homólogos a MAX4 descritos son *RMS1* en guisante (Sorefan *et al.*, 2003), *DAD1* en petunia (Snowden *et al.*, 2005) y *DWARF10* en arroz (Arite *et al.*, 2007). Para MAX1 aún no se han descrito homólogos en otras especies.

Los mutantes *max* son más ramificados que las plantas silvestres, pero además son algo más bajos, tienen menor desarrollo radicular y hojas redondeadas con pecíolos más cortos (Stirnberg *et al.*, 2002; Sorefan *et al.*, 2003).

Los genes MAX actúan en una misma ruta genética. Para establecer el orden de estos genes en la ruta se realizaron experimentos de microinjertos con los distintos mutantes y se estudió su capacidad para rescatar el fenotipo silvestre. Los injertos corresponden a la parte aérea de la planta, donde se producen las yemas axilares. Los portainjertos corresponden a la parte radicular de la planta. De esta forma se determinó en un principio que al poner injertos *max* sobre portainjertos silvestres, el fenotipo de ramificación de estos mutantes desaparecía. Injertos silvestres sobre portainjertos mutantes también generaban plantas de ramificación normal. Esto indicaba que la señal se transmitía a distancia en la planta (Morris *et al.*, 2001; Turnbull *et al.*, 2002; Sorefan *et al.*, 2003).

MAX3 (*AtCCD7*) y MAX4 (*AtCCD8*) están al principio de la ruta. Estos genes son miembros de las dioxigenasas involucradas en la ruptura oxidativa de los carotenoides que intervienen en la síntesis de ácido abscísico (ABA, Booker *et al.*, 2004). Sin embargo, ambos genes forman un grupo separado dentro de estas dioxigenasas y no parecen intervenir directamente en la síntesis de ABA (Tan *et al.*, 2003). Ni *max3* ni *max4* presentan alteraciones en los niveles de ABA ni fenotipos asociados a una deficiencia de ABA

(Sorefan *et al.*, 2003; Booker *et al.*, 2004). *MAX3* y *MAX4* se expresan principalmente en plastidios de raíces (Booker *et al.*, 2004; Sorefan *et al.*, 2003). Estos genes parecen actuar uno tras otro: en ensayos bioquímicos en *E. coli* se ha probado que el producto de la acción de *MAX3* es el sustrato de *MAX4*, que genera a su vez un derivado carotenoides que actuaría reprimiendo el desarrollo de las yemas axilares (Schwartz *et al.*, 2004).

El siguiente gen en la ruta es *MAX1*, ya que los portainjertos de *max1* suprimen el fenotipo mutante de injertos *max3* o *max4*, ya que la parte radicular (silvestre para *MAX3* y *MAX4*) ya ha producido el precursor de *MAX1*. Por el contrario, injertos de *max1* sobre portainjertos de *max3* o *max4* producen plantas más ramificadas (Booker *et al.*, 2005). *MAX1* codifica para *CYP711A1*, un citocromo P450 de la clase III y se expresa en el tejido vascular de las plantas de forma generalizada (Booker *et al.*, 2005).

Por su parte *MAX2* actuaría al final de esta ruta, posiblemente en los nudos de la planta, cerca de las yemas axilares. Portainjertos de *max3* no rescatan fenotipo de injertos de *max2*, mientras que injertos de *max3* sobre portainjertos de *max2* producen plantas con ramificación normal (Booker *et al.*, 2005). *MAX2* codifica para una proteína con F-box (Woo *et al.*, 2001). Estas proteínas señalan a otros factores para su degradación vía ubiquitina-proteasoma (Kipreos y Pagano, 2000). *MAX2* se expresa de forma ubicua en las plantas, pero principalmente en tejido vascular de órganos en desarrollo y también en los nudos (Stirnberg *et al.*, 2007).

Se ha propuesto que los genes *MAX* actúan controlando la capacidad de transporte de auxinas en el tallo regulando la cantidad de las proteínas PIN (Bennett *et al.*, 2006). Puesto que la capacidad de la yema para desarrollarse depende de su capacidad para exportar auxinas, los genes *MAX* actuarían bloqueando esta capacidad de transporte (Bennett *et al.*, 2006).

#### 4.4. Acción de otras hormonas en el control de la ramificación

El ácido abscísico tiene un papel reconocido en el mantenimiento de la dormición de yemas en especies leñosas (Frewen *et al.*, 2000; Rodhe *et al.*, 2002). De hecho una de sus primeras denominaciones fue la de *dormina*. En herbáceas, la aplicación de ABA a yemas axilares inhibe su desarrollo (Tamas *et al.*, 1979). En el cadillo (*Xanthium strumarium*) se ha encontrado que los niveles de ABA en las yemas axilares son muy elevados y tras la decapitación de las plantas estos niveles se reducen en gran medida (Tucker y Mansfield, 1973). En *Arabidopsis* algunos mutantes hipersensibles a ABA, como *enhanced response to aba1* (*era1*), tienen, crecidas en día corto, muy pocas ramas laterales, tanto de roseta como caulinares (Pei *et al.*, 1998). *ERA1* codifica para una subunidad de la farnesil-transferasa, que actúa adicionando grupos farnesil a proteínas para su anclaje a las membranas (Bonetta *et al.*, 2000). Sin embargo el ácido abscísico no parece mediar entre las auxinas y su efecto en la represión del desarrollo de las yemas axilares (Chatfield *et al.*, 2000; Cline y Oh, 2006).

En cuanto al etileno, su relación con el control del desarrollo axilar no parece clara. En guisante, por ejemplo, sus niveles parecen correlacionarse con la inhibición de las yemas. Tras decapitar plantas de guisante, en las yemas axilares que se desarrollan se detecta una disminución en los niveles de etileno. Por otro lado al aplicar auxinas en la parte decapitada los niveles de etileno aumentan (Blake *et al.*, 1983). Sin embargo este aumento en los niveles de etileno no parece tener ningún papel en la inhibición de las yemas, al

menos en *Arabidopsis*. En plantas transgénicas que sobreexpresan genes de síntesis de auxinas de *A. tumefaciens* los niveles de etileno son también muy altos y las plantas son poco ramificadas (Romano *et al.*, 1993). Sin embargo mediante aproximaciones moleculares y de genética clásica se han obtenido plantas que siguen sobreexpresando auxinas pero no etileno, y estas plantas siguen siendo poco ramificadas (Romano *et al.*, 1993). Estudios más recientes tampoco asignan un papel destacado del etileno en el control del desarrollo de las yemas axilares (Chatfield *et al.*, 2000). Por otro lado, en el manejo de cultivos se suele usar el etefón (ácido 2-cloro etil fosfónico) que libera lentamente etileno, para reducir la dominancia apical en frutales y en ornamentales (Dole y Wilkins, 1999) aunque no todas las especies responden a este tratamiento (Hayashi *et al.*, 2001).

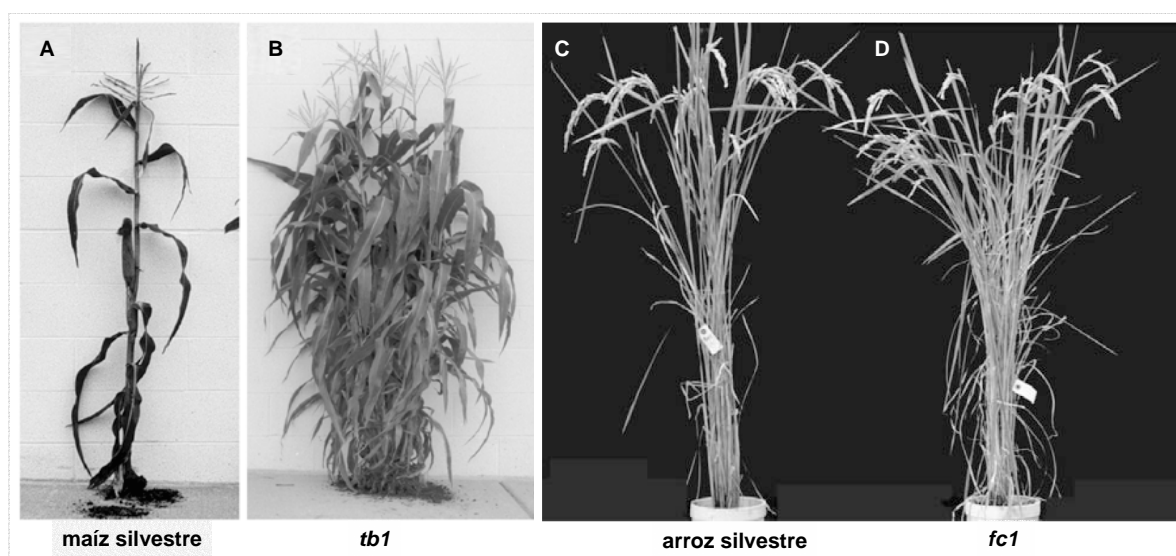
Respecto a las giberelinas y los brasinosteroides, su papel en el control de la dormición tampoco está claro. En guisante y en *Coleus*, la aplicación de giberelinas junto con auxinas a plantas decapitadas aumenta la dominancia apical (Jacobs y Case, 1965; Scout *et al.*, 1967; Okoloko y Lewis, 1968), si bien en otros experimentos similares ocurre lo contrario (Phillips, 1969). En el mutante de tomate *torosa-2*, donde el 70% de las hojas no tienen yemas (Mapelli y Rocchi, 1985), la aplicación de giberelinas estimula la producción de yemas laterales (Mapelli y Kinet, 1992). En relación con los brasinosteroides, las plantas resultantes de cruzar el mutante ramificado *rms2* de guisante con el mutante de porte bajo y deficiente en brasinosteroides *lkb* suprimen el fenotipo de ramificación de *rms2* (Ross *et al.*, 2007). En *Arabidopsis*, *dwf4-101*, un alelo débil de *DWARF4*, un gen implicado en la síntesis de brasinosteroides, forma rosetas pequeñas y de hojas redondeadas y las plantas son de porte bajo y muy ramificadas (Nakamoto *et al.*, 2006).

### 5. *Teosinte branched1* de maíz: genes *TCP* y control de la ramificación

Además de los genes que actúan a distancia para suprimir la ramificación, como los genes *MAX*, se han identificado otros que actúan dentro de la yema axilar y que inhiben directamente el crecimiento de esta. Nos referimos a *Teosinte branched1* (*Tb1*) de maíz y sus homólogos en otras especies. En las plantas de maíz las yemas axilares se forman pero no dan lugar a ramas (Fig. 4A). En cambio en los mutantes *tb1* las yemas axilares se desarrollan y la planta presenta un aspecto ramificado similar al de su ancestro silvestre teosinte (Fig. 4B). *Tb1* también es responsable del acortamiento de entrenudos y el aborto de estambres en la inflorescencia femenina o mazorca, por lo que en los mutantes *tb1* hay una conversión de inflorescencias femeninas a masculinas (Doebley *et al.*, 1995). *Tb1* se expresa en meristemas axilares pero también en los primordios de los estambres de las flores de la mazorca (Hubbard *et al.*, 2002). En arroz el homólogo de *Tb1* es *OsTb1* (Hu *et al.*, 2003; Takeda *et al.*, 2003). La mutación en *OsTb1*, *fine culm1* (*fc1*), también produce plantas más ramificadas (Figs. 4C, D; Hu *et al.*, 2003; Takeda *et al.*, 2003; Goto *et al.*, 2005). *OsTb1* se expresa en meristemas y yemas axilares, en la base del meristemo apical del tallo, en tejido vascular del tallo y en la unión de la lámina al tallo (Takeda *et al.*, 2003).

Durante la domesticación del maíz se seleccionaron formas con menos ramas y más rendimiento, adaptadas al cultivo en alta densidad de plantación. Esta selección se correlaciona con una selección de formas con altos niveles de expresión de *Tb1*. Estos elevados niveles de *Tb1* parecen ser suficientes para impedir el crecimiento axilar y alterar de manera profunda la arquitectura de la planta (Doebley *et al.*, 1997; Wang *et al.*,

1999). La selección se produjo en las zonas reguladoras, ya que el grado de polimorfismo del promotor de *Tb1* de las variedades de maíz actuales sólo tiene el 3% del grado de polimorfismo de sus ancestros los teosintes (Wang *et al.*, 1999). Esta baja grado de polimorfismo está asociado a una menor plasticidad en la arquitectura de las plantas en respuesta a cambios en la densidad de plantación, y por tanto a variaciones en la razón R:RL. Esta menor plasticidad también está relacionada con el control de los niveles de *Tb1* (Lukens y Doebley, 1999). En sorgo se ha demostrado una relación entre *SbTB1* y la respuesta de huida de la sombra. En plantas crecidas en alta densidad de plantación los niveles de expresión de *SbTb1*, homólogo de *Tb1*, están más elevados. También ocurre esto en plantas de sorgo mutantes para *PHYB*, que tienen una respuesta constitutiva al síndrome de huida de la sombra y sus yemas axilares reprimidas (Kebrom *et al.*, 2006; Kebrom y Brutnell, 2007).

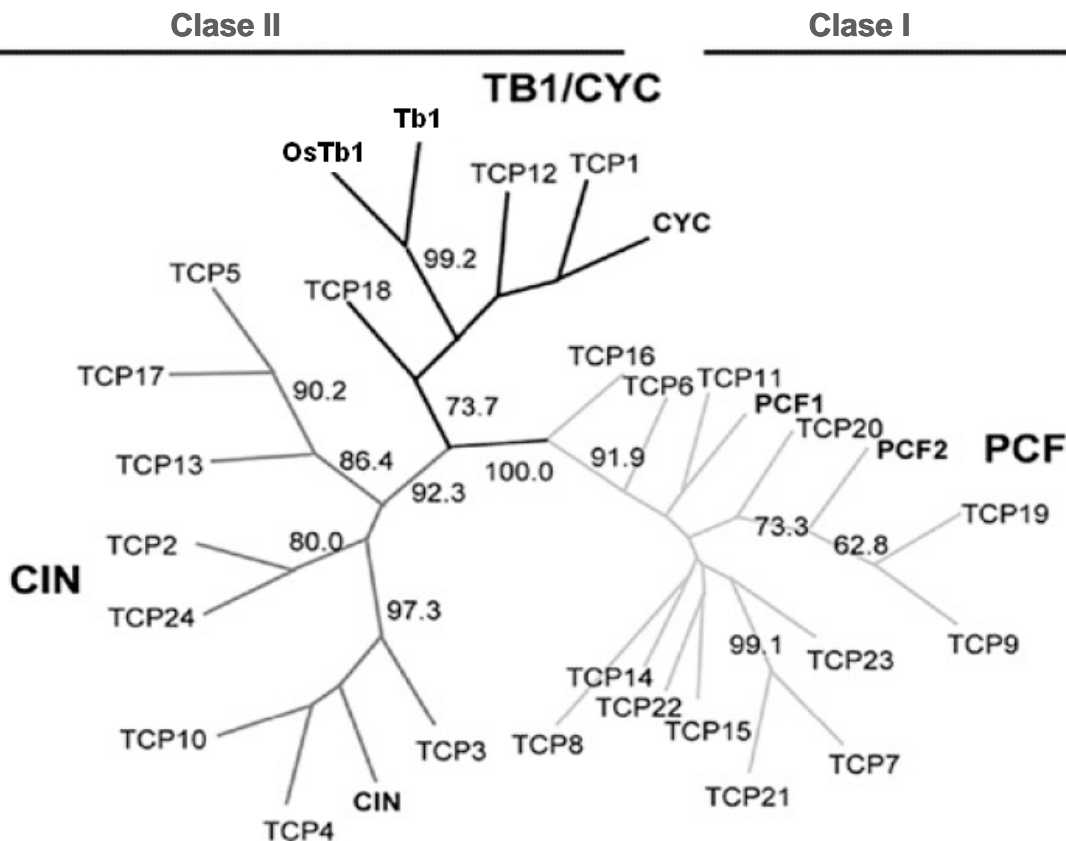


**Figura 4.** A) Planta silvestre de maíz cultivado. B) Planta del mutante *tb1*. C) Planta silvestre de arroz. D) Planta mutante *fc1* de arroz. A y B tomadas de Doebley *et al.*, (1997); C y D de Goto *et al.*, (2005).

*Tb1* pertenece a la familia de genes *TCP* específicos de plantas, que codifican para factores de transcripción (Fig. 5; Cubas *et al.*, 1999). Las siglas *TCP* corresponden a las iniciales de los genes *Tb1* de maíz, *CYCLOIDEA* (*CYC*) de *Antirrhinum majus* y *PCF1* y *PCF2* de arroz. En el genoma de *Arabidopsis* hay 24 genes *TCP* (Cubas, 2002) y 22 en el de arroz (Yao *et al.*, 2007). Las proteínas para las que codifican se caracterizan por contener la caja *TCP*, un dominio bHLH no canónico de 55-59 aas que confiere capacidad de unión a DNA y a otras proteínas, y localización nuclear (Kosugi y Ohashi, 1997; Cubas *et al.*, 1999; Kosugi y Ohashi, 2002). Algunas proteínas de esta familia contienen además un dominio R rico en argininas cuya función podría estar relacionada con las interacciones proteína-proteína (Cubas *et al.*, 1999).

Atendiendo a la estructura del dominio *TCP* de las proteínas de esta familia, se pueden establecer dos clases: clase I y clase II (Fig. 5). Funcionalmente las proteínas de clase I se unen a las secuencias GGNCCCAC, mientras que las de clase II lo hacen a las secuencias G<sup>T</sup>/cGGNCCC, solapante con la anterior (Kosugi y Ohashi, 1997; Kosugi y Ohashi, 2002). En *Arabidopsis* la clase I está formada por 13 genes relacionados con los genes *PCF1* y

PCF2 de arroz. Los PCFs controlan la transcripción del gen *PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN* (PCNA), implicado en la replicación del DNA y la progresión del ciclo celular (Kosugi y Ohashi, 1997). Un gen muy relacionado en *Arabidopsis* a los PCFs, *TCP20*, actúa en el control del ciclo celular activando directamente la expresión de la ciclina *CYCB1;1* y también activa genes de proteínas ribosomales (Tremousaygue *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005; Welchen y Gonzalez, 2006). *TCP16*, el miembro más divergente de la clase I, afecta al desarrollo del polen (Takeda *et al.*, 2006) y *TCP14* al de las semillas (Tatematsu *et al.*, 2007).



**Figura 5.** Árbol filogenético de los 24 factores TCP de *A. thaliana*. Las proteínas TCP se dividen en dos clases, clase I y clase II. Las de clase I o grupo PCF se muestran en gris claro. Entre las de clase II se distinguen los grupos CIN (ramas en gris oscuro) y CYC/TB1 (en negro). En el árbol se incluyen como referencia las proteínas *Tb1* de maíz, *OsTb1* de arroz, *CYC* y *CIN* de *Antirrhinum majus*, y *PCF1* y *PCF2* de arroz. Tomado de Aguilar-Martínez *et al.* (2007).

Por su parte los genes de la clase II pueden dividirse en dos grupos, el grupo *CIN* (del gen *CINCINNATA* de *Antirrhinum*; Nath *et al.*, 2003) y el grupo *CYC/TB1* (Fig. 5; Cubas *et al.*, 1999). En *Arabidopsis* el grupo *CIN* está formado por ocho genes que intervienen en el control del desarrollo de las hojas (Palatnik *et al.*, 2003; Koyama *et al.*, 2007). La falta de función de *TCP2*, *TCP3*, *TCP10*, *TCP24* y sobre todo de *TCP4*, produce plantas con hojas recurvadas. Estos genes están controlados negativamente por un *microRNA*, *mi319* o *mir-JAW*. En la mutación *jaw-D miR319* está sobreexpresado, y esto hace que los niveles de expresión de estos genes *TCP* estén muy reducidos y que las plantas tengan las hojas recurvadas (Palatnik *et al.*, 2003). Una mutación en el homólogo de *TCP4* de *Antirrhinum*, *CINCINNATA* (*CIN*), también produce hojas curvadas en lugar de planas (Nath *et al.*, 2003). En tomate la mutación *Lanceolate* (*La*), que afecta al homólogo de *TCP4*, haciéndolo



resistente al sitio de reconocimiento de *miR319*, convierte la hoja normal, compuesta, en una hoja simple (Ori *et al.*, 2007).

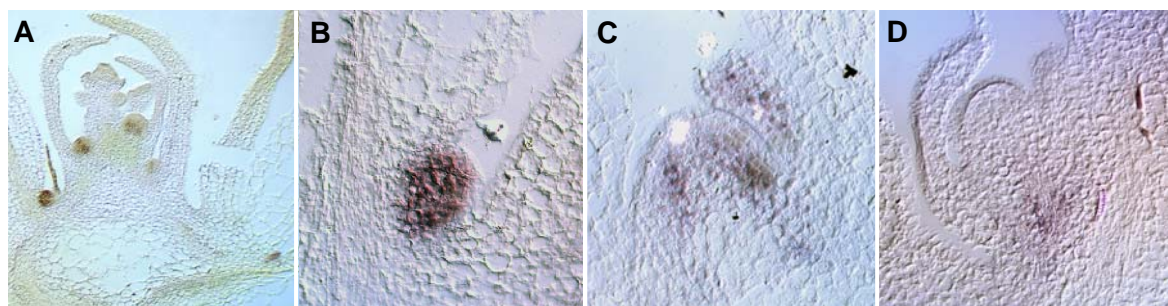
Respecto al grupo *CYC/TB1*, en *Antirrhinum* el gen *CYCLOIDEA* (*CYC*) controla la formación de flores zigomorfas junto con su parólogo *DICHOTOMA* (*DICH*; Luo *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1999). El doble mutante *cyc dich* tiene flores radialmente simétricas, a diferencia de las plantas silvestres cuyas flores son bilateralmente simétricas. Ambos genes se expresan en la región dorsal de los meristemos florales. Este papel de los genes *CYCLOIDEA* se encuentra también en Leguminosas, familia en la que la mayoría de sus grupos tienen flores con simetría bilateral. *squared standard1* (*squ1*), que tiene una mutación en *LjCYC2*, un homólogo de *CYC/DICH* en *Lotus japonicus*, también afecta a la simetría bilateral de las flores (Feng *et al.*, 2006).

En *Arabidopsis* los genes del grupo *CYC/TB1* son *TCP1*, *TCP18* y *TCP12* (Fig. 5). El homólogo a *CYC* en *Arabidopsis* es *TCP1*. Aunque esta especie tiene flores radialmente simétricas, *TCP1* se expresa de forma transitoria en el dominio dorsal de los meristemos axilares florales y vegetativos (Cubas *et al.*, 2001). La función de *TCP1* es todavía desconocida ya que sus mutantes tienen fenotipo silvestre.

En nuestro laboratorio estábamos interesados en determinar si el homólogo de *Tb1* en *Arabidopsis* tenía un papel importante en el control de la ramificación. Ya que *TCP1* es el homólogo de *CYC* de *Antirrhinum*, los posibles homólogos funcionales de *Tb1* podrían ser *TCP18* y/o *TCP12* (Fig. 5; Cubas, 2002).

### 5.1. Patrón de expresión de los genes *TCP18* y *TCP12*

En nuestro laboratorio se ha determinado por hibridación *in situ* el patrón de expresión de los genes *TCP18* y *TCP12*. Estos genes se expresan desde el principio del desarrollo axilar, en meristemos axilares (Figs. 6A, B). Posteriormente, en yemas vegetativas, se expresan en los primordios de las hojas (Fig. 6C). En yemas axilares florecidas su ARNm se detecta en el tejido vascular en desarrollo (Fig. 6D). En yemas que están empezando a elongar no se detecta expresión de estos genes. Este patrón de expresión apoya la hipótesis de que estos genes tienen un posible papel durante el desarrollo de las yemas axilares. La expresión de *TCP12* se detecta principalmente en el tejido provascular de la yema. Actualmente y como resultado de lo encontrado en este trabajo hemos renombrado estos genes *BRANCHED1* (*BRC1*), a *TCP18*, y *BRANCHED2* (*BRC2*) a *TCP12*. Por simplicidad a partir de ahora nos referiremos a ellos con este nombre.



**Figura 6.** Distribución del ARNm de *TCP18* detectado mediante hibridación *in situ*. **A)** Vista general de una sección longitudinal de una roseta de *Arabidopsis* que está iniciando la elongación del tallo principal tras la floración. **B)** Detalle de la expresión en un meristemo axilar. **C)** Distribución del ARNm en primordios de hoja en yemas axilares vegetativas. **D)** Expresión en tejido vascular en yemas reproductivas. El patrón de distribución del ARNm de *TCP12* es similar a la de *TCP18* aunque más tenue. Tomado de Aguilar-Martínez *et al.* (2007).



## Objetivos

El control de los patrones de ramificación determina de forma fundamental la arquitectura de las plantas. Sin embargo su control genético es todavía poco conocido. En monocotiledóneas un gen de la familia TCP, *Teosinte branched1*, tiene un papel central en este proceso. Los objetivos de esta Tesis son:

1. Identificar y caracterizar en *Arabidopsis* los homólogos funcionales de *Teosinte branched1* de maíz.
2. Establecer la relación de estos genes con las rutas genéticas y de señalización que controlan el desarrollo de los meristemas y yemas axilares.
3. Identificar regiones reguladoras necesarias para la expresión silvestre de estos genes.

## **Materiales y Métodos**

## 1. Materiales

### 1.1. Estirpes bacterianas

*Escherichia coli*:

**DH5 $\alpha$** : *supE44*  $\Delta$ *lacU169* ( $\Phi$ 80 *lacZ*  $\Delta$ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1* (Hanahan, 1983).

**DB3.1<sup>TM</sup>**: F- *gyrA462* *endA1*  $\Delta$ (*sr1-recA*) *mcrB* *mrr* *hsdS20* (*rB*-, *mB*-) *supE44* *ara-14* *galK2* *lacY1* *proA2* *rpsL20*(*Sm<sup>R</sup>*) *xyl-5*  $\lambda$ - *leu* *mtl1* (Invitrogen).

*Agrobacterium tumefaciens*:

**C58C1**: *rif<sup>r</sup>* con pGV2260, *cb<sup>r</sup>* (Deblaere *et al.*, 1985).

**AGL0**: *rif<sup>r</sup>* (Lazo *et al.*, 1991).

### 1.2. Cepas de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)

**Y187**: *MAT $\alpha$* , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *gal4 $\Delta$* , *met<sup>-</sup>*, *gal80 $\Delta$* , *URA3* : : *GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ*, *MEL1* (Harper *et al.*, 1993).

**YTS-1**: *MAT $\alpha$* , *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *gal4 $\Delta$* , *met<sup>-</sup>*, *gal80 $\Delta$* , *URA3* : : *GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ*, *MEL1* (Harper *et al.*, 1993).

**AH109**: *MAT $\alpha$* , *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 $\Delta$* , *gal80 $\Delta$* , *LYS2* : : *GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3*, *GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2*, *URA3* : : *MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ*, *MEL1* (James *et al.*, 1996; Clontech).

### 1.3. Material vegetal

Los alelos y líneas de *RNAi* usadas de los genes *BRC1* y *BRC2* se indican en la Tabla 1. Los mutantes *max1-1*, *max2-1*, *max3-9* y *max4-1* fueron cedidos por O. Leyser (University of York, Reino Unido), *las-4* por K. Theres (Max-Planck Institute, Cologne), *ifl-1* por Z. H. Ye (University of Athens, USA), los mutantes *phyA* y *phyB* por J.A. Jarillo (INIA, Madrid) y *yucca1* por A. Caño (Institut de Biologia Molecular de Barcelona).

**Tabla 1.** Alelos y líneas de *RNAi* para los genes *BRC1* y *BRC2*.

Alelo	Fondo genético	Tipo de mutación	Línea	Fuente
<i>brc1-1</i>	Columbia	Inserción de T-DNA	GABI 471F06	GABI-Kat
<i>brc1-2</i>	Columbia	Inserción de T-DNA	Salk 091920	Colección Salk
<i>brc1-3</i>	Columbia ( <i>Big Mama</i> )	EMS	CS90653	TILLING
<i>brc1-4</i>	Columbia ( <i>Big Mama</i> )	EMS	CS90308	TILLING
<i>brc1-5</i>	Columbia	Inserción de T-DNA	GABI 659E10	GABI-Kat
<i>brc1 RNAi</i>	Columbia	<i>RNAi</i>		Nuestro laboratorio
<i>brc2-1</i>	Columbia	Inserción de T-DNA	Salk 023116	Colección Salk
<i>brc2 RNAi</i>	Columbia	<i>RNAi</i>		Nuestro laboratorio

Utilizamos plantas de los ecotipos de *Arabidopsis thaliana* (Heynh.) Columbia (Col-0), Landsberg *erecta* (Ler), C-24, Llagostera (Ll-0), Shahkdara (Sha) y Wassilewskija (Ws) (los cuatro últimos proporcionados por C. Alonso (CNB-CSIC).

Para el aislamiento de secuencias reguladoras de *BRC1* en especies del género *Arabidopsis* estudiamos *A. lasiocarpa*, *A. pumila*, *A. arenosa* y *A. korshinskyi*, cuyas semillas obtuvimos del NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, <http://arabidopsis.info/Browse/Page>). También utilizamos plantas de patata (*Solanum tuberosum* L. var. Desirée), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. 'Microtom'; Scott y Harbaugh, 1989) y *Nicotiana benthamiana*.

## 1.4. Plásmidos

Los vectores base utilizados en este trabajo se indican en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Plásmidos base usados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Origen
pBluescript® II SK <sup>+</sup>	Vector de clonación; <i>Amp<sup>r</sup></i> en bacteria	Stratagene <sup>1</sup>
pDONR™ 201	Vector de clonación según la tecnología Gateway®; <i>Kan<sup>r</sup></i> en bacteria	Invitrogen <sup>2</sup>
pDONR™ 207	Vector de clonación según la tecnología Gateway®; <i>Gent<sup>r</sup></i> en bacteria	Invitrogen <sup>2</sup>
pENTR4™	Vector de clonación según la tecnología Gateway®; <i>Kan<sup>r</sup></i> en bacteria	Invitrogen <sup>2</sup>
pGADT7	Vector reportero y de integración en levadura para clonar ADNc en la técnica de híbrido sencillo; <i>Amp<sup>r</sup></i> en bacteria	Clontech <sup>3</sup>
pGEM®-T Easy	Vector de clonación de productos de PCR; <i>Amp<sup>r</sup></i> en bacteria	Promega <sup>4</sup>
pGWB1	Vector binario según la tecnología Gateway®; casete no promotor - no tag; <i>Kan<sup>r</sup></i> en bacteria, <i>Kan<sup>r</sup> Hyg<sup>r</sup></i> en planta	T. Nakagawa <sup>5</sup>
pGWB3	Vector binario según la tecnología Gateway®; casete no promotor - C-GUS; <i>Kan<sup>r</sup></i> en bacteria, <i>Kan<sup>r</sup> Hyg<sup>r</sup></i> en planta	T. Nakagawa <sup>5</sup>
pGWB4	Vector binario según la tecnología Gateway®; casete no promotor - C-sGFP; <i>Kan<sup>r</sup></i> en bacteria, <i>Kan<sup>r</sup> Hyg<sup>r</sup></i> en planta	T. Nakagawa <sup>5</sup>
pGWB5	Vector binario según la tecnología Gateway®; casete p35S - C-sGFP; <i>Kan<sup>r</sup></i> en bacteria, <i>Kan<sup>r</sup> Hyg<sup>r</sup></i> en planta	T. Nakagawa <sup>5</sup>
pGWB6	Vector binario según la tecnología Gateway®; casete p35S - N-sGFP; <i>Kan<sup>r</sup></i> en bacteria, <i>Spc<sup>r</sup> Hyg<sup>r</sup></i> en planta	T. Nakagawa <sup>5</sup>
pAlligator1	Vector binario según la tecnología Gateway®; casete 2xp35S - 3xHA-VP16AD; <i>Kan<sup>r</sup></i> en bacteria, fluorescencia en planta	F. Valverde <sup>6</sup>
pHisi	Vector reportero y de integración en levadura para clonar de fragmentos de promotor en 5' del gen de la histidina ( <i>HIS3</i> ) para la técnica de híbrido sencillo; <i>Amp<sup>r</sup></i> en bacteria	Clontech <sup>3</sup>
pTi0046	Vector binario; casete promotor m35S - C-GUS; <i>Kan<sup>r</sup></i> en bacteria y en planta	R. Bustos <sup>7</sup>

<sup>1</sup> Stratagene, <http://www.stratagene.com/products/displayProduct.aspx?pid=267>

<sup>2</sup> Invitrogen, <http://www.invitrogen.com/>

<sup>3</sup> Clontech, <http://www.clontech.com/>

<sup>4</sup> Promega, [http://www.promega.com/enotes/applications/ap0039\\_tabs.htm](http://www.promega.com/enotes/applications/ap0039_tabs.htm)

<sup>5</sup> Tsuyoshi Nakagawa, Res. Ins. Mol. Genet., Shimane University, Japón (Nakagawa *et al.*, 2007)

<sup>6</sup> F. Valverde, IBVF-CSIC, Sevilla

<sup>7</sup> R. Bustos, Dpto. Genética Molecular de Plantas, CNB-CSIC, Madrid

## 1.5. Cebadores

Los cebadores usados en este trabajo se muestran en el Anexo I (Tabla 2) y fueron obtenidos de las casas Sigma (<https://www.sigmaaldrich.com/>) o Invitrogen (<http://www.invitrogen.com/>).

## 1.6. Genotecas y BACs

Para realizar el escrutinio de híbrido sencillo utilizamos una genoteca normalizada de ADNc obtenida a partir de ARNs poliA<sup>+</sup> de plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia de diferentes estadios de desarrollo. Los ADNc se obtuvieron utilizando dos tipos de cebadores, oligo dT y cebadores aleatorios, por tanto hay dos tipos de genotecas. Ambas se integraron por separado en pGADT7. Las genotecas fueron generadas por Hans Sommer (Max-Planck Institute, Colonia, Alemania) y proporcionadas por Simona Masiero (*Università degli studi di Milano*, Italia).

Para obtener las secuencias reguladoras de *SITCP1* y *SITCP2* utilizamos una genoteca de ADN genómico de tomate (*Solanum lycopersicum* L. var. VF36) generada según la técnica de *Genome Walking*, proporcionada por J. M. Davière (CNB-CSIC).

Para el aislamiento de las secuencias reguladoras de *BRC1* de *Brassica rapa* empleamos los BACs KBrH001F07, KBrH094O01, KBrH119P04 y KBrH136C20 (<http://jicgenomelab.co.uk/jgl/>).

## 2. Métodos

### 2.1. Cultivos bacterianos

Los cultivos bacterianos se crecieron en medio LB (Lennox, 1955). Para los medios sólidos se utilizó LB con agar al 1.5%. Las concentraciones de los antibióticos selectivos utilizados fueron ampicilina (100 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml), higromicina B (40 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml) y rifampicina (50 µg/ml). Todos los antibióticos se obtuvieron de Duchefa (<http://www.duchefa.com/>). Las cepas de *E. coli* crecieron a 37°C y las de *Agrobacterium* a 28°C. Las estirpes se conservaron a corto plazo a 4°C y a largo plazo a -80°C en glicerol al 60%.

### 2.2. Cultivos de levadura

El crecimiento de las cepas de levadura se realizó en YSD o en YPAD en medio líquido o en medio sólido añadiendo agar al 1.5%.

La preparación del YSD y del YPAD, así como las concentraciones *stock* de los aminoácidos selectivos utilizados se encuentra en *Yeast Protocols Handbook* (Clontech, <http://www.clontech.com/images/pt/PT3024-1.pdf>). Las cepas se crecieron a 30°C y se conservaron a corto plazo a 4°C y a largo plazo a -80°C en glicerol al 60%.

### 2.3. Cultivo de plantas

Las semillas de *Arabidopsis* se sometieron a estratificación (3 días en oscuridad a 4°C) para sincronizar la germinación. Las plantas de *Arabidopsis* se crecieron *in vitro* (temperatura de 22°C, fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, humedad del 34%); en cámara climatizada o en invernadero (en torno a 22°C y 16 h de luz, naturales o suplementadas con luz incandescente). Las plantas de patata, tomate o *Nicotiana benthamiana* se crecieron *in vitro* y en invernadero en las mismas condiciones que las descritas para *Arabidopsis*.

El medio de crecimiento de las plantas de invernadero o cámara climatizada fue una mezcla de tierra y vermiculita. Las plantas de *Arabidopsis* se crecieron en bandejas de 28, 60 o 96 alvéolos o en tiestos de 12 cm de diámetro. Las plantas de patata, tomate y *Nicotiana* se cultivaron también en tiestos.

Para las plantas crecidas *in vitro* se utilizaron las mismas condiciones de luz, temperatura y humedad y el medio de cultivo fue GM [1x MS (Duchefa), 1% sacarosa (Duchefa), 0.1% MES (Sigma), 0.8% agar (p/v); pH 5.7]. Las semillas se esterilizaron con 70% lejía y 0.05% Tween-20 (v/v) durante 7' en agitación.

### 2.4. Análisis fenotípicos

Para la caracterización de los patrones de ramificación de los mutantes se cuantificaron el número de ramas caulinares primarias (CI) y secundarias (CII) y el de ramas de roseta primarias (RI) y secundarias (RII) (Fig. 12A). No se consideraron mayores grados de ramificación. Las medidas se realizaron 3 semanas después de la aparición del botón floral. Se consideraron ramas los brotes laterales mayores de 0.5 cm.

#### a) Experimento de déficit hídrico

Plantas silvestres y mutantes *brc* se crecieron hasta el inicio de la elongación de la inflorescencia principal en condiciones normales de riego. Para el experimento del

recuento del número de ramas, durante tres semanas parte de las plantas se regaron de forma habitual (1l/bandeja cada 3-4 días) mientras que otra parte se regó con la mitad de agua. Para el experimento de cuantificación del ARNm se crecieron plantas silvestres hasta el inicio de la floración en condiciones de riego normales, luego parte se siguió regando en estas condiciones hasta ~0.5 cm de inflorescencia principal y otra parte no se regó hasta recoger el material para su procesado.

### **b) Ensayo de densidad**

En la caracterización de mutantes *BRC* crecidos a distintas densidades de plantación, se ensayaron densidades de 1, 4, 9 y 16 plantas por alvéolo en bandejas de 28 alvéolos.

## **2.5. Transformación de bacterias**

### **a) Transformación de *E. coli***

Las células competentes para transformación se obtuvieron por el método de RbCl (Hanahan, 1983) y las electrocompetentes, según Dower *et al.*, 1988. Las transformaciones se realizaron por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989) o mediante electroporación utilizando un equipo *Electro Cell Manipulator 600* de BTX (<http://www.btxonline.com/>).

### **b) Transformación de *A. tumefaciens***

Las células electrocompetentes de *Agrobacterium* se prepararon según Mersereau *et al.*, 1990 y transformaciones se llevaron a cabo según Höfgen y Willmitzer (1988) mediante electroporación utilizando el mismo equipo del apartado anterior.

## **2.6. Transformación de levadura**

Las células competentes de levadura y las transformaciones con el método de LiAc se realizaron según el *Yeast Protocols Handbook* de Clontech, (<http://www.clontech.com/images/pt/PT3024-1.pdf>).

## **2.7. Transformación de plantas**

### **a) *Arabidopsis thaliana***

Para transformar *Arabidopsis* se utilizó el método de *floral dip* (Clough y Bent, 1998) con ligeras modificaciones. Las plantas T<sub>0</sub> se crecieron en tiestos de 12 cm de diámetro (~30 semillas por tiesto) hasta que empezaron a florecer, utilizándose cuando se formaban las primeras silicuas.

Los cultivos de *Agrobacterium* portadores de la construcción correspondiente se crecieron hasta el final de su crecimiento exponencial ( $DO_{600} \approx 0.8$ ). Se centrifugaron 10' a 4500 rpm y el sedimento se resuspendió en medio de infiltración [0.5x MS, 5% sacarosa, 0.05% MES, 2% Silwet L-77 (Lehle Seeds)].

Las plantas de cada tiesto se sumergieron en 300 ml de medio de infiltración durante 5', se aclararon con agua y se mantuvieron en el invernadero hasta obtener las semillas.

Para identificar individuos T<sub>1</sub> transgénicos, las semillas obtenidas se sembraron en placas Petri de 150 mm de diámetro (~3000 semillas por placa) con medio GM y el antibiótico adecuado. Las plántulas T<sub>1</sub> resistentes se trasplantaron y crecieron en el

invernadero hasta obtener semillas. Para identificar líneas transgénicas con una única inserción se seleccionaron aquellos individuos T<sub>1</sub> cuya progenie T<sub>2</sub> segregaba en proporción 3:1 plantas resistentes:sensibles en placas con el antibiótico adecuado. Los individuos T<sub>2</sub> resistentes se transplantaron y crecieron en el invernadero hasta obtener semillas. De los individuos T<sub>3</sub> se seleccionaron para su posterior estudio los homocigotos para el transgén, esto es, aquéllas en las que todos sus descendientes eran resistentes al antibiótico específico.

### **b) *Solanum lycopersicum***

La transformación de tomate se realizó según McCormick *et al.* (1986) con modificaciones. Se germinaron semillas de tomate durante 8-10 días en medio estéril (1xMS con 0.7% agar y 2% sacarosa). Se cortaron los cotiledones de las plántulas y se colocaron en placas de medio MS sin antibióticos ni reguladores de crecimiento con una capa de células de tabaco BY-2 durante 24 h. La cepa de *Agrobacterium* con la construcción adecuada se cultivó durante 16 h en 3 ml de LB con kanamicina y rifampicina. Se hizo una dilución 1/100 en el mismo medio LB con antibióticos y se dejó crecer hasta DO<sub>560</sub>≈0.5. El cultivo se centrifugó 10' a 4500 rpm y se resuspendió en el mismo volumen de MS y 2% sacarosa. Los cotiledones fueron dañados mecánicamente y sumergidos en el medio MS con *Agrobacterium* durante 2-3' con agitación suave. Se secaron los cotiledones en papel de filtro para eliminar el exceso de bacterias y se colocaron de nuevo en la placa con MS y la capa de células BY-2. A las 48 h se traspasaron a medio MS con 1.6% glucosa (Duchefa), 0.7% agar, pH=5.6, kanamicina (50 µg/ml), cefotaxime (500 µg/ml, Duchefa) y zeatina (2 µg/ml, Sigma). A los 7 días se traspasaron a medio MS con 1.6% glucosa, 0.7% agar, kanamicina (50 µg/ml), cefotaxime (250 µg/ml) y zeatina (1 µg/ml). A la semana siguiente se redujo la concentración de zeatina hasta 0.5 µg/ml. Los brotes que aparecieron se cortaron por la base y se traspasaron a medio MS con 1.6% glucosa, kanamicina, cefotaxime (250 µg/ml) y ácido indolacético (IAA, 0.5 µg/ml, Duchefa). Tras el enraizamiento, los explantos fueron transferidos a tierra y crecidos en el invernadero.

### **c) *Solanum tuberosum***

Para la transformación de patata se siguió el protocolo de Royo *et al.* (1999). A partir de plántulas de patata crecidas *in vitro* se cortaron varias hojas transversalmente en tiras eliminando el pecíolo y se depositaron con el envés hacia arriba en una placa Petri con medio MS y 2% sacarosa. Se preparó un inóculo fresco de *Agrobacterium* como se describe más arriba. Se añadieron 50 µl del cultivo de *Agrobacterium* al medio con las hojas y se agitó con suavidad 5', manteniéndose luego sin agitación durante dos días en oscuridad. Las hojas se secaron en papel de filtro y se pusieron durante una semana en placas con MS y 1.6% glucosa, 0.7% agar, ácido naftalenacético (NAA, 5 µg/ml, Duchefa), 6-bencilaminopurina (6-BAP, 0.1 µg/ml, Duchefa), higromicina B (30 µg/ml) y cefotaxime (400 µg/ml). Los explantos se trapasaron, renovándose cada 10 días, a placas MS y 1.6% glucosa, 0.7% agar, zeatina ribóxido (2 µg/ml, Duchefa), NAA (0.02 µg/ml), GA<sub>3</sub> (1 µg/ml, Duchefa), higromicina B (30 µg/ml) y cefotaxime (250 µg/ml)]. Los brotes con meristemo apical funcional se cortaron y separaron de la parte callosa, traspasándose a tarros con medio MS y 2% sacarosa y con kanamicina hasta que enraizaron, tras lo cual se transplantaron a tierra y se crecieron en el invernadero.



**d) *Nicotiana benthamiana***

Para los experimentos de expresión transitoria se usaron plantas de *Nicotiana benthamiana* que se agroinfiltraron según Llave *et al.* (2000).

**2.8. Aislamiento y purificación de ácidos nucleicos**

Para el aislamiento y purificación de ADN plasmídico de *E. coli* se utilizó el Plasmid Midi Kit de QIAGEN (<http://www.qiagen.com/>). El aislamiento y purificación de plásmidos de *Agrobacterium* se realizó con el método de fenol:cloroformo (Sambrook *et al.*, 1989). El ADN de plásmido de levadura se extrajo a partir de cultivos de 3 ml de YPAD con glucosa al 5% O/N y posterior centrifugación a 14000 rpm durante 5' a temperatura ambiente. A cada muestra se le añadió 200 µl de solución de lisis para levadura [2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA], 200 µl de cloroformo-fenol frío y ~0.3 g de perlitas de vidrio (Sigma G-8772). Las mezclas se vortexearon 2' y se centrifugaron 5' a 14000 rpm a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante al que se le añadió 20 µl de 3M NaAc y 500 µl de etanol absoluto. Se centrifugó 15' a 14000 rpm y al sobrenadante obtenido se le añadió 500 µl de etanol 70%. Se centrifugó 3' a 14000 rpm, se tiró el sobrenadante y se secó el precipitado, resuspendiéndolo en 20 µl de agua bidestilada. Se añadió 1 µl de RNasa y se dejó 30' a 37°C. Se almacenó a -20°C.

Para las extracciones de ADN genómico de plantas se siguió el método de Bernatzky y Tanksley (1986) o se usó el DNeasy Plant Minikit de QIAGEN (<http://www.qiagen.com/>).

Las extracciones de ARN se hicieron con TRIzol® (Invitrogen). Las trazas de ADN se eliminaron con TURBO DNA-free™ (Ambion).

Las concentraciones de ADN y ARN se determinaron con Nanodrop® ND-1000.

**2.9. Amplificación de ADN por PCR**

Para la amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR se utilizaron las polimerasas termoestables Taq DNA polymerase y AmpliTaqGold™ de Roche (<http://www.roche-applied-science.com/>). Para amplificar fragmentos de ADN de forma fidedigna se usó Pwo DNA Polymerase (Roche).

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Gene Amp® PCR System 2700 (Applied Biosystems). Los fragmentos amplificados se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% en tampón TBE 0.5x [Tris-borato 0.045 M, EDTA 0.001 M]. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con Gel Doc 2000 (Bio-Rad).

**2.10. Genotipado de mutantes**

Las condiciones para el genotipado mediante PCR de las líneas mutantes analizadas se muestran en la Tabla 3. *max3-9*, *amp1-1*, *ifl1-1* y *ycc1* se determinaron por fenotipo y *max4-1* lleva una inserción que contiene el gen *bar* seleccionable por aplicación del herbicida BASTA® (O. Leyser, com. pers.). Los mutantes *phyA* y *phyB* se genotiparon según Neff *et al.* (1998).

**Tabla 3.** Genotipado de mutantes. Se indican los cebadores utilizados, amplicón generado y condiciones para su realización.

Mutante	Cebadores silvestre/mutante	Amplicón (Kb) silvestre/mutante	Restricción y fragmento de digestión (pb) silvestre/mutante	Referencia
<i>brc1-1</i>	BRC1ATG;TCP18EX1/GABI1;TCP18EX1	0.65/0.75		
<i>brc1-2</i>	TCP18W;TCP18FINAL/LB-1;TCP18FINAL	1/0.6		
<i>brc1-3</i>	TCP18A;TCP18Z	1	AflIII: 25,119/144	
<i>brc1-4</i>	TCP18A;TCP18Z	1	MboI: 956/495,461	
<i>brc1-5</i>	TCP18W;TCP18FINAL/GABI1;TCP18B	1/0.6		
<i>brc2-1</i>	TCP12 5';TCP12 3'/LB-1;TCP12 3'	1/0.6		
<i>max1-1</i>	max1F;max1R	0.125/	AluI: /89,36	(Stirnberg <i>et al.</i> 2002)
<i>max2-1</i>	max2F;max2R	0.404/	TSP509: 206/285	(Stirnberg <i>et al.</i> 2002)

### 2.11. Construcción de plásmidos

Los plásmidos generados en este trabajo se indican en la Tabla 3 del Anexo I.

### 2.12. Secuenciación de ADN

Las reacciones de secuenciación fueron realizadas en la Unidad de Genómica (Parque Científico de Madrid, <http://www.ucm.es/info/gyp/genomica/>) y en Secugen (<http://www.secugen.es/>).

### 2.13. Amplificación de secuencias reguladoras en varios ecotipos de *Arabidopsis* y especies relacionadas

Las secuencias reguladoras en 5' de *BRC1* en ecotipos de *Arabidopsis* se aislaron por PCR usando los cebadores PromD y TCP18C. En el caso de las especies *Arabidopsis* se obtuvieron las secuencias reguladoras en 5' de *BRC1* utilizando los cebadores Brc1-K-5' y RT-PCR-BRC1-B. En ambos casos los fragmentos se clonaron en pGEM-T y se secuenciaron.

### 2.14. RT-PCR cuantitativas

El material analizado en las RT-PCR cuantitativas (qRT-PCR) fue rosetas de plantas con ~0.5 cm de inflorescencia principal. De estas rosetas se recortaron las hojas hasta la base de los pecíolos, la raíz y el tallo principal dejando intactas las yemas. Se realizaron 3 réplicas biológicas de 5 a 10 rosetas de las que se extrajo ARN.

Para las reacciones se utilizó 1µg de ARN. Los ADNc se generaron con FastStart Taqman® Probe Master-Rox (Roche). Los cebadores y las sondas Taqman® se eligieron de acuerdo con *Universal ProbeLibrary for Arabidopsis* de Roche (<http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/adc.jsp>). Las sondas Taqman® empleadas se indican en la Tabla 4. Las reacciones de qRT-PCR se hicieron en 7300 Realtime PCR System (Applied Biosystems) y se analizaron con 7300 Systems SDS Software Version 1.3 (Applied Biosystems).

**Tabla 4.** Sondas Taqman® empleadas para realizar las qRT-PCRs.

Gen	Sonda Taqman®
<i>BRC1</i>	68
<i>BRC2</i>	140
<i>ACTINA8</i>	78
<i>uidA</i>	59
<i>ARR5</i>	17

### 2.15. Tratamientos con auxinas

Se crecieron plantas silvestres hasta que la inflorescencia principal medía ~0.5 cm. Dos días después dos tercios se decapitaron y se les aplicó apicalmente MS-agar+IAA 10  $\mu$ M o sólo MS-agar. Se recogió el material a las 24 h.

### 2.16. Tratamientos con citoquininas

Plantas silvestres con inflorescencia principal de ~0.5 cm fueron pulverizadas con una solución de zeatina 10  $\mu$ M en agua y Tween 20 al 0.5%. Un número equivalente de plantas en el mismo estadio se pulverizó con la misma solución sin zeatina. Se recogió material a las 6 h y a las 24 h.

### 2.17. Tratamientos de calidad de luz

Se colocaron plantas silvestres con inflorescencia principal de ~0.5 cm en una cámara de calidad de luz controlada (modelo *Percival E-30LEDL3*, Percival Scientific Inc., L.A., USA, deferencia de J.A. Jarillo, INIA) bajo unas condiciones de ratio de luz roja:luz roja lejana (R:RL) de 0.15 frente a plantas control (1.1). Las plantas se mantuvieron durante 10 h, transcurridas las cuales se procesaron las plantas.

### 2.18. Tratamientos de cantidad de luz

Plantas silvestres se crecieron en una cámara de cultivo con una intensidad de luz de 4200 luxes hasta que sus inflorescencias principales medían ~0.5 cm. En este momento la mitad de las plantas se mantuvieron en las mismas condiciones y la otra mitad se transfirió a una cámara con 910 luxes de intensidad de luz. A las 24 h se procedió a recoger el material para su análisis. Las intensidades de luz se determinaron con un luminómetro *Gossen*.

### 2.19. Determinaciones cualitativas de $\beta$ -glucuronidasa (GUS)

Las tinciones GUS se realizaron en todos los casos según Sessions *et al.* (1999).

### 2.20. Detección de la actividad de la proteína fluorescente verde (GFP)

Para detectar la presencia de la proteína GFP (variante sGFP[S65T]; Heim *et al.*, 1994) se utilizó un microscopio *Leyca MZFLIII* con fuente de luz ultravioleta (filtro de emisión de 525-550 nm; filtro de excitación de 470 nm). También se estudió la presencia de GFP con un microscopio confocal del servicio de Microscopía del CNB.

### 2.21. Ensayo de híbrido sencillo

El ensayo de híbrido sencillo se llevó a cabo según Kooiker *et al.* (2005) y el sistema MATCHMAKER One-Hybrid System (Clontech, catálogo K-1603-1). Los fragmentos de promotor se integraron en los sitios EcoRI y XbaI de pHis (Tabla 2, Anexo II). Con estas construcciones se transformó la cepa de levadura Y187. Con las levaduras transformadas se realizó un ensayo de autoactivación: se crecieron en medio selectivo con distintas concentraciones de 3-AT (Sigma A-8056). La genoteca normalizada de ADNc de *Arabidopsis* (Aptdo. 1.6) está integrada en el plásmido pGADT7 en la cepa AH109. Se realizó una conjugación entre esta cepa y la Y187 transformada. Para ello se creció esta última en 50 ml de YSD -his (o -ura) y glucosa al 5% a 250 rpm y 30°C hasta una  $DO_{600} \approx 0.8$ .

El cultivo se centrifugó a 3000 rpm durante 15' a 21°C. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 50 ml de 2xYPAD y glucosa 5%. Se añadió al resuspendido 120 µl de cada uno de los 2 tipos de genoteca y el cultivo se puso en un matraz de 2 l, a 40 rpm, 30°C y 16 h. El cultivo se centrifugó a 2000 rpm, 20' y 21°C. El sedimento se resuspendió en YPAD:0.09% NaCl y se sembró en placas Petri de 150 mm de diámetro con medio YSD-his-leu y con la concentración de 3-AT determinada en el ensayo de autoactivación. Las placas se pusieron a 30°C 5-6 días. Las colonias obtenidas se resembraron en placas YSD-his-leu+3-AT. De las estrias resistentes se extrajeron los plásmidos pGADT7 y se secuenciaron para determinar el ADNc presente en tales plásmidos.

## **2.22. Programas informáticos**

### **a) Análisis de secuencias**

Los archivos de secuenciación se manejaron inicialmente con ChromasPro (<http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html>).

El análisis de secuencias se realizó con el paquete *Lasergene* de DNASTAR (<http://www.dnastar.com/products/lasergene.php>).

En el manejo de secuencias se usaron las aplicaciones disponibles en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y en SEQUEROME™ (<http://www.sequerome.georgetown.edu/sequerome/>).

Los alineamientos de secuencias se realizaron con ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) y se visualizaron con JALVIEW2.3 (<http://www.jalview.org/index.html>).

La identificación de motivos de unión a factores de transcripción se realizó con PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>), PLANTCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>), SOFTBERRY (<http://www.softberry.com/cgi-bin/programs/promoter/nsitep.pl>) y PATCH (<http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/patch/bin/patch.cgi>). Se consultó la base de datos de factores de transcripción de plantas PlantTFDB (<http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v1.0/>).

La búsqueda de patrones de secuencias determinados en alineamientos múltiples se realizó con RSAT (<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>).

### **b) Análisis estadísticos**

El análisis estadístico de los datos se realizó con Microsoft® Excel 2002 y con STATISTICA® 5.1 (StatSoft, 1995). Se usaron las pruebas de comparación de medias *t* de Student para dos promedios y la de Newman-Keuls para comparaciones múltiples. En su caso asteriscos o letras distintas indican valores de medias significativamente diferentes. El nivel de significación fue  $p < 0.05$ .

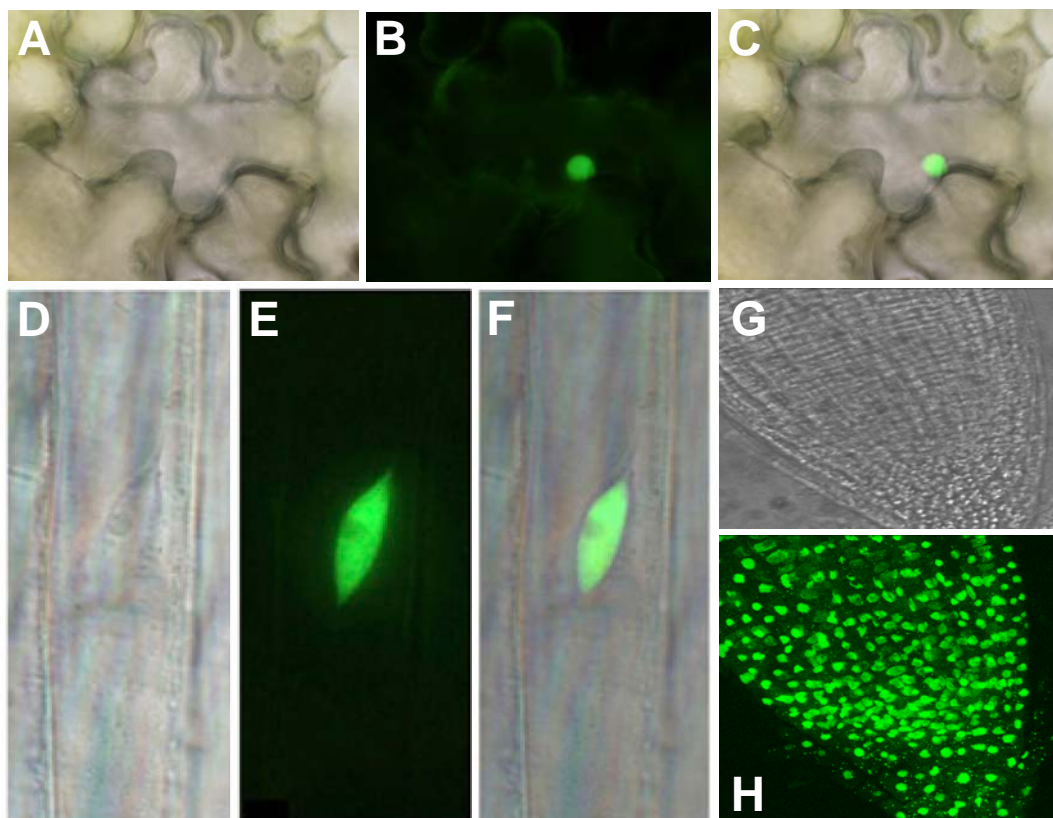
## **Resultados**

## 1. Análisis funcional de los genes *BRC1* y *BRC2*

### 1.1. Las proteínas *BRC1* y *BRC2* actúan en el núcleo celular

*BRC1* y *BRC2* codifican para posibles factores de transcripción, por tanto es probable que actúen en el núcleo. Para determinar si *BRC1* y *BRC2* se localizan nuclearmente realizamos construcciones fusionando la zona codificante de sus genes a la del gen de la proteína verde fluorescente, GFP, bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (p35SCaMV), que a partir de ahora llamaremos p35S.

Primero expresamos estas construcciones de forma transitoria en células de epidermis de hojas de *Nicotiana benthamiana* mediante agroinfiltración y observamos que las proteínas GFP::*BRC1* y GFP::*BRC2* se localizaban en el núcleo (Figs. 7A-C para *BRC1*, *BRC2*, no mostrado). Posteriormente generamos plantas transgénicas de *Arabidopsis* con las mismas construcciones y estudiamos la localización celular de GFP en líneas T3 (Figs. 7D-H). En estas plantas la GFP también se localizaba nuclearmente.



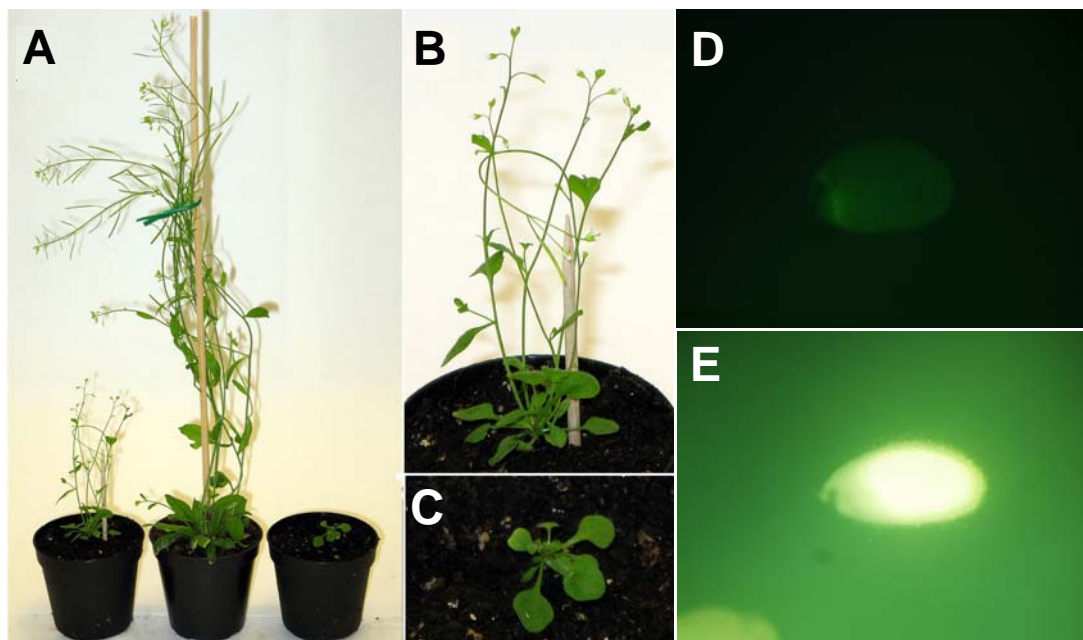
**Figura 7.** Localización nuclear de las proteínas BRC. **A)** Imagen en campo claro de células epidérmicas de una hoja de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltrada con la construcción p35S::*GFP::BRC1*. **B)** Localización de GFP en la hoja mostrada en **A**. **C)** Superposición de las imágenes de **A** y **B**. **D)** Imagen en campo claro de una célula de raíz de *Arabidopsis* portadora de la construcción p35S::*GFP::BRC1*. **E)** Localización de GFP en la célula mostrada en **D**. **F)** Superposición de **D** y **E**. **G)** Imagen en campo claro de un ápice de raíz de *Arabidopsis* con la construcción p35S::*GFP::BRC2*. **H)** Localización nuclear de GFP en el ápice mostrado en **G**. **H** se realizó con microscopía confocal. Las fusiones de control a GFP no presentaban localización nuclear de GFP (no mostrado).

Estos resultados son consistentes con un posible papel de *BRC1* y *BRC2* como factores de transcripción.

### 1.2. Exceso de función de *BRC1* y *BRC2*

Para determinar el efecto que produce la sobreexpresión constitutiva de *BRC1* y *BRC2* estudiamos líneas transgénicas T3 portadoras de las construcciones del apartado anterior p35S::GFP::*BRC1* y p35S::GFP::*BRC2*. La sobreexpresión de *BRC1* da lugar a plantas con una tasa de desarrollo más lenta que la de las plantas silvestres, con rosetas más pequeñas, menor número de hojas, plantas de menor altura y con fertilidad reducida (Figs. 8A-C). La sobreexpresión de *BRC2* no presenta alteraciones fenotípicas (no mostrado).

Por otro lado fusionamos las regiones codificantes de *BRC1* y *BRC2* al potente dominio de activación transcripcional VP16 (Parcy y Nilsson, 1998) bajo el control de p35S. Con estas construcciones transformamos *Arabidopsis* pero ninguna de las semillas transgénicas germinaron (Figs. 8D, E). Estos resultados sugieren que los genes *BRC* actúan de forma similar a otros genes TCP de la clase II: provocan un retraso o arresto del crecimiento en las células donde se expresan (Luo *et al.*, 1996; Hubbard *et al.*, 2002; Nath *et al.*, 2003; Palatnik *et al.*, 2003).



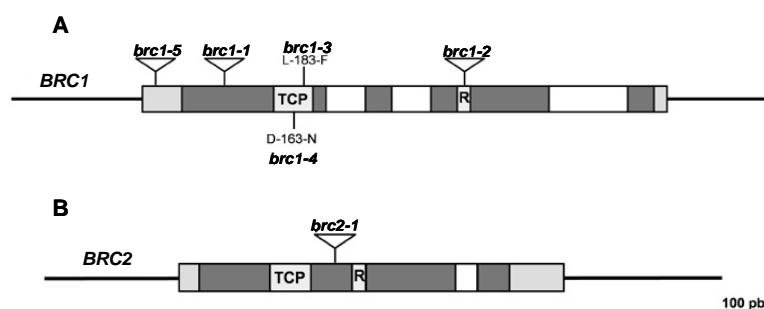
**Figura 8.** Sobreexpresión del gen *BRC1*. **A)** Izquierda y derecha, individuos de dos líneas independientes portadoras de la construcción p35S::GFP::*BRC1*; centro, planta silvestre. Las plantas han sido crecidas durante 40 días en las mismas condiciones. **B-C)** Detalle de las plantas transgénicas. **D)** Imagen bajo luz ultravioleta de una semilla de *Arabidopsis* silvestre. **E)** Imagen de una semilla T1 transformada con la construcción p35S::VP16-*BRC1* que lleva una selección de GFP en semilla.

### 1.3. Falta de función de *BRC1* y *BRC2*

Para determinar la función de los genes *BRC1* y *BRC2* identificamos líneas mutantes para dichos genes y analizamos su fenotipo. Para *BRC1* estudiamos 5 alelos (Fig. 9A). Tres de ellos, *brc1-1*, *brc1-2* y *brc1-5* son mutantes de inserción de T-DNA (Alonso *et al.*, 2003; Rosso *et al.*, 2003). En *brc1-1* la inserción está a +218 pb del ATG y produciría una proteína de 72 aas. En *brc1-2* la inserción está en el dominio R y daría lugar a una proteína truncada de 208 aas. La inserción en *brc1-5* está en la región 5'UTR del gen. *brc1-3* y *brc1-4* son mutantes puntuales generados con EMS (Till *et al.*, 2003) y cambian aminoácidos



conservados del dominio TCP. También estudiamos líneas de *RNAi* generadas en el laboratorio. Para *BRC2* estudiamos el mutante *brc2-1* que tiene una inserción de T-DNA entre los dominios TCP y R (Alonso *et al.*, 2003; Fig. 9B) y líneas de *RNAi*. Además analizamos el doble mutante *brc1-2 brc2-1*.



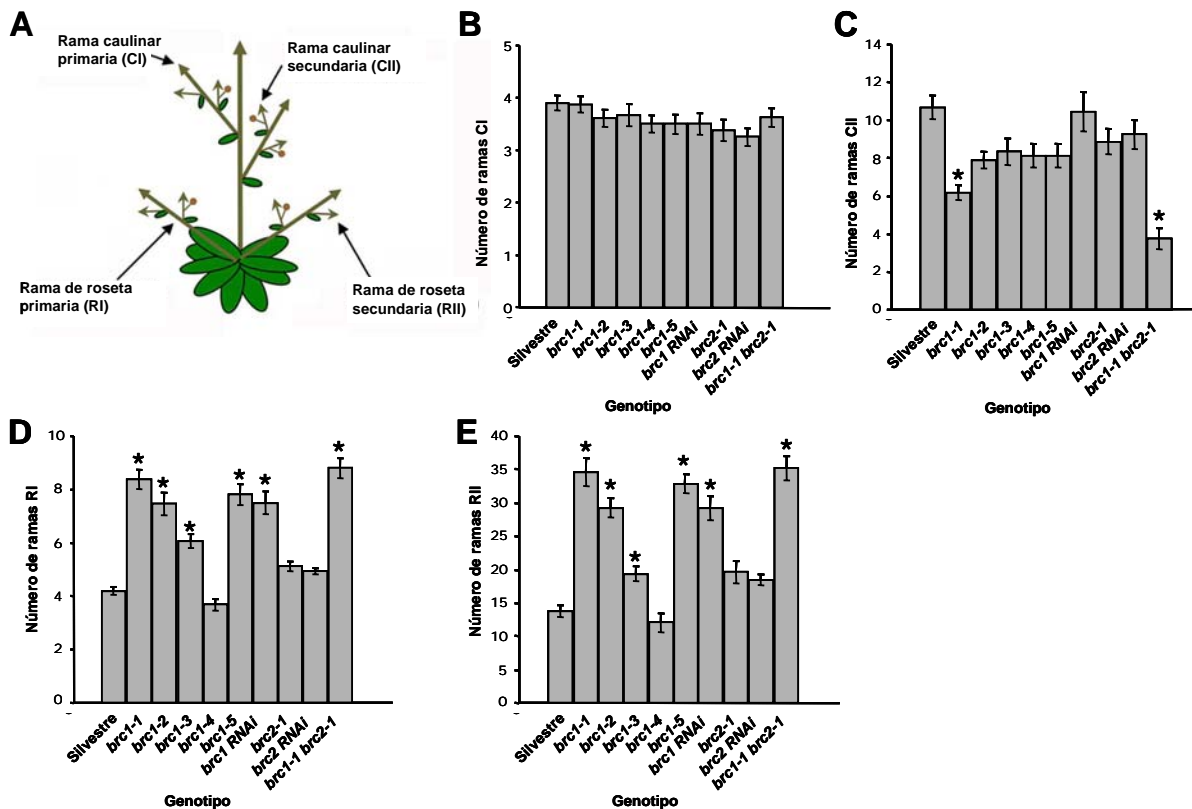
**Figura 9.** Esquema de la estructura genómica de *BRC1* (A) y *BRC2* (B). Los exones se indican como cajas gris oscuro, los intrones como cajas blancas, las regiones 5' y 3'UTR como cajas grises. Los triángulos indican las inserciones de T-DNA, las líneas indican las mutaciones puntuales, los cambios de aminoácidos que producen y su posición. Los dominios TCP y R se indican enmarcados en cajas en gris claro.

Para estudiar su fenotipo crecimos las plantas mutantes y las silvestres en día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad) y comparamos sus patrones de ramificación 3 semanas después de la aparición del botón floral (Figs. 10 y 11). Observamos que las mutaciones en estos genes no afectan al número de ramas caulinares primarias (CI; Fig. 11B). El número de ramas caulinares secundarias (CII) es igual al de las plantas silvestres en todos los mutantes excepto en *brc1-1* y en el doble mutante *brc1-2 brc2-1* en los que es menor (Fig. 11C). En cambio, el número de ramas de roseta primarias y secundarias (RI y RII) es significativamente mayor en todos los mutantes *brc1* que en las plantas silvestres (Figs. 11D, E) excepto en el mutante puntual *brc1-4*. Los mutantes *brc2* no tienen un número significativamente mayor de ramas RI y RII que las plantas silvestres (Figs. 11D, E). Además el número de ramas RI y RII del doble mutante *brc1-2 brc2-1* es similar al de *brc1-2*.



**Figura 10.** Plantas de *Arabidopsis* silvestre y mutantes para *BRC1* (*brc1-1* y *brc1-2*) y *BRC2* (*brc2-1*), 3 semanas después de la aparición del botón floral.





**Figura 11.** Fenotipo de ramificación de mutantes para *BRC1* y *BRC2* y de plantas silvestres. **A)** Esquema de una planta de *Arabidopsis* ya florecida, en el que se representan las ramas caulinares primarias (CI), caulinares secundarias (CII), de roseta primarias (RI) y de roseta secundarias (RII). Flechas, puntos de crecimiento indeterminado; círculos, puntos de crecimiento determinado (flores). **B)** Número de ramas caulinares primarias, CI. **C)** Número de ramas caulinares secundarias, CII. **D)** Número de ramas de roseta primarias, RI. **E)** Número de ramas de roseta secundarias, RII. n=15-32.

En conclusión, la falta de función de *BRC1* da lugar a plantas con mayor número de ramas de roseta. Esto indica que *BRC1* está implicado en el control de la ramificación en *Arabidopsis*. Los mutantes *brc1* no presentan ninguna otra alteración fenotípica, lo que apoya el papel específico de *BRC1* en este proceso. *BRC2* por el contrario parece tener un papel irrelevante en este proceso, al menos en día largo (ver más abajo).

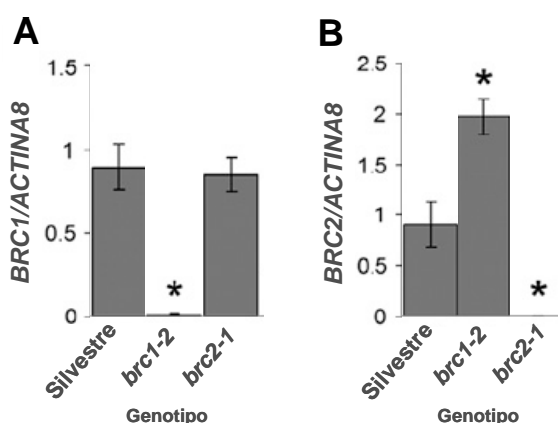
Al crecer los mutantes en condiciones de día corto (8 h de luz y 16 h de oscuridad) observamos que durante el desarrollo vegetativo de la planta las yemas axilares de los mutantes *brc1-2* están mucho más desarrolladas que las de las plantas silvestres y que los mutantes *brc2-1* también presentan este fenotipo (Fig. 12). Esto indica que en condiciones de día corto *BRC2* también tiene un papel en el control del desarrollo temprano de las yemas axilares.

#### 1.4. Regulación cruzada de los genes *BRC*

Para estudiar la posible existencia de una regulación cruzada entre *BRC1* y *BRC2*, estudiamos los niveles de ARNm de cada uno de los genes en mutantes de falta de función del otro. Encontramos que los niveles de ARNm de *BRC1* no están afectados en mutantes *brc2* (Fig. 13A). Por el contrario, en los mutantes *brc1* los niveles de ARNm de *BRC2* están más elevados que en las plantas silvestres lo que sugiere la existencia de un mecanismo de compensación o regulación negativa de los niveles de ARNm de *BRC2* por parte de *BRC1* (Fig. 13B).



**Figura 12.** Fenotipo de los mutantes *brc1-2* y *brc2-1* en día corto. En el panel superior se muestran rosetas vegetativas de plantas crecidas 50 días en día corto. De izquierda a derecha, mutante *brc1-2*, planta silvestre y mutante *brc2-1*. En el panel inferior se muestran las mismas plantas sin las hojas de la roseta para mostrar el desarrollo de las yemas axilares.



**Figura 13.** Niveles de expresión de *BRC1* y *BRC2* en mutantes *brc*. **A)** Niveles de expresión de *BRC1* en plantas silvestres, *brc1-2* y *brc2-1*. **B)** Niveles de expresión de *BRC2* en plantas silvestres, *brc1-2* y *brc2-1*. Niveles de ARNm relativos a *ACTINA8*.

### 1.5. Análisis genético de *BRC1*

Como *BRC1* tiene un papel más importante que *BRC2* en el control de la ramificación, nos hemos centrados principalmente en el estudio genético de *BRC1*.

Nuestro siguiente objetivo fue establecer la relación de *BRC1* con otros genes que también actúan en este proceso. Para ello elegimos mutantes que afectan de una forma específica y no pleiotrópica la formación de meristemos y yemas axilares y la elongación de ramas.

#### a) Relación de *BRC1* con genes de iniciación de meristemos axilares

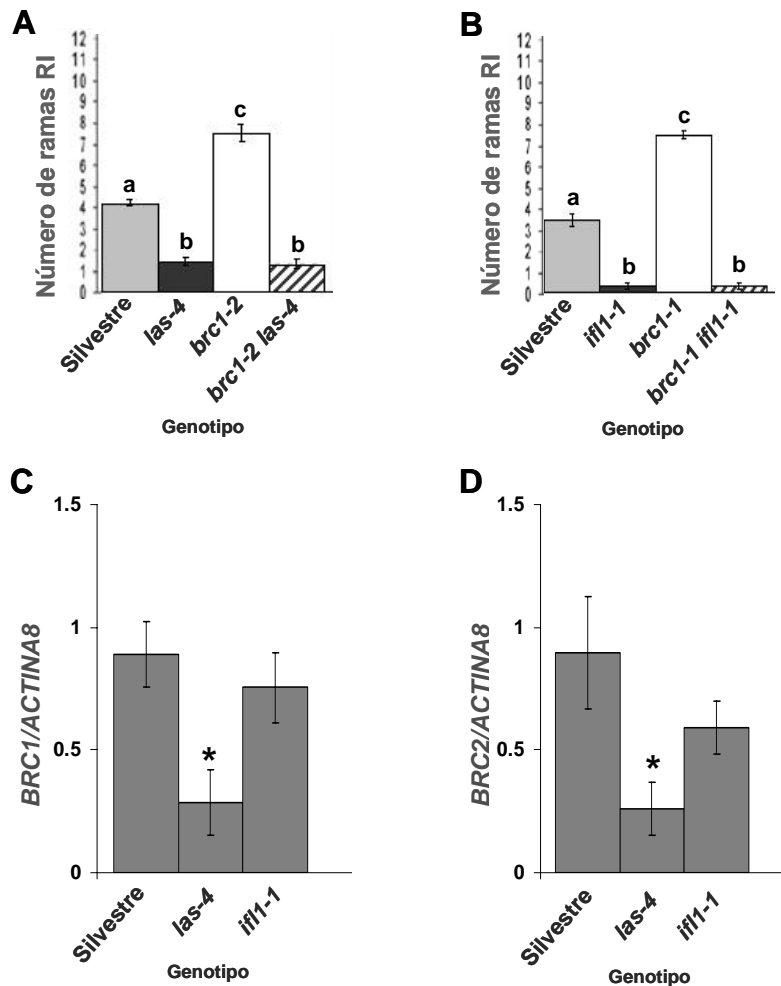
*LAS* e *IFL/REV* participan en el proceso de formación de los meristemos axilares (ver Introducción). Las mutaciones en estos genes producen plantas menos ramificadas que

las silvestres (Figs. 14A, B; Otsuga *et al.*, 2001; Greb *et al.*, 2003).

Generamos dobles mutantes *brc1-2 las-4* (Fig. 14A) y *brc1-1 ifl1-1* (Fig. 14B) y cuantificamos el número de ramas RI, que es el carácter más afectado en los mutantes *brc1* (Fig. 11).

Los dobles mutantes *brc1-2 las-4* tienen un número de ramas RI similar al de *las-4* (Fig. 14A). De igual forma, los dobles mutantes *brc1-1 ifl1-1* son como el mutante *ifl1-1* (Fig. 14B). Esto indica que las mutaciones *las-4* e *ifl1-1* son epistáticas sobre la mutación *brc1*.

Además cuantificamos mediante qRT-PCR los niveles de ARNm de *BRC1* y de *BRC2* en los mutantes *las-4* e *ifl1-1*. En *las-4* los niveles de ambos genes están significativamente reducidos (Fig. 14C). Pensamos que esto no es debido a una regulación directa de *LAS* sobre la transcripción de *BRC1* sino a que en este mutante se forma un menor número de meristemos axilares, región donde se expresa *BRC1*. En *ifl1-1* los niveles de *BRC1* y de *BRC2* están sólo moderadamente reducidos respecto al silvestre (Fig. 14D).



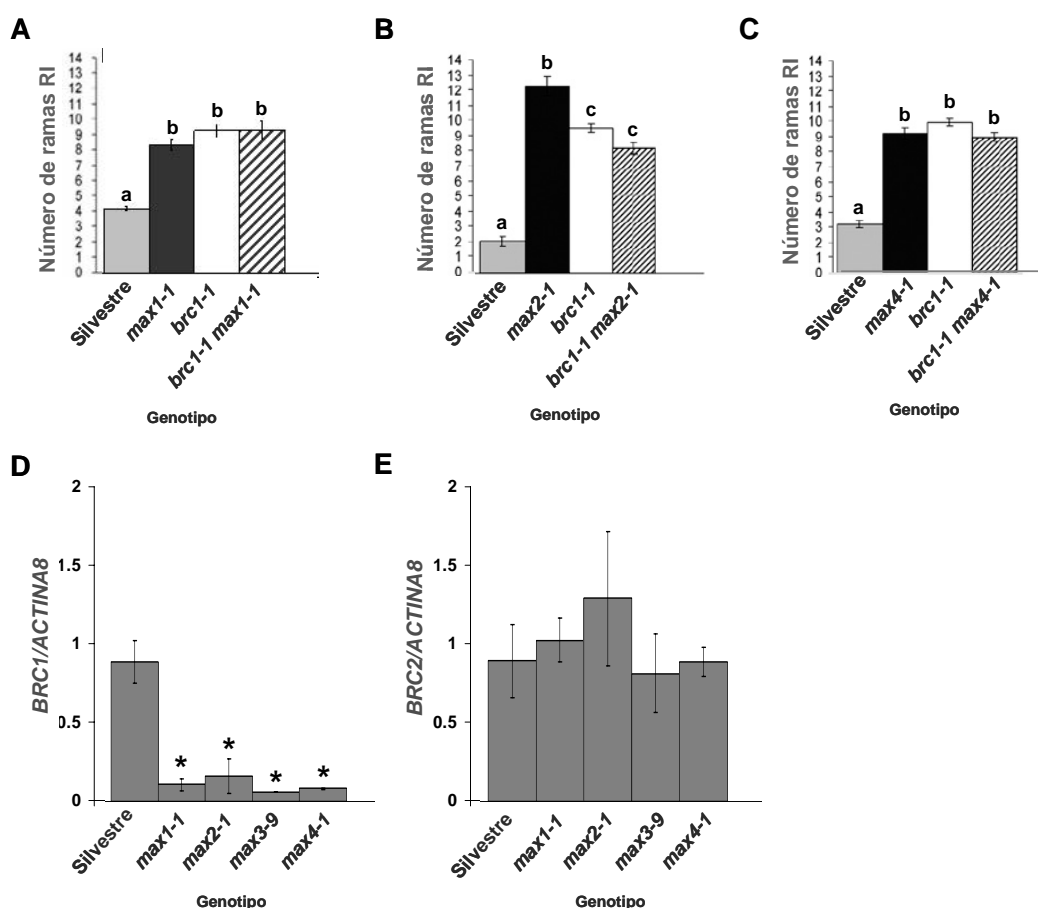
**Figura 14.** Relación de *BRC1* con genes de iniciación de meristemos axilares. A) Número de ramas RI de plantas silvestres, mutantes *las-4*, *brc1-2* y dobles mutantes *brc1-2 las-4*. B) Número de ramas RI en plantas silvestres, mutantes *ifl1-1*, *brc1-1* y dobles mutantes *brc1-1 ifl1-1*. n=13-31. C) Niveles de expresión de *BRC1* en mutantes *las4* e *ifl1* relativos a los de *ACTINA8*. D) Niveles de expresión de *BRC2* en los mismos mutantes.

### b) Relación de *BRC1* con la ruta MAX de señalización

Los genes *MAX* actúan en una misma ruta genética y controlan la producción y acción de un derivado carotenóide de composición aún desconocida y que actuaría reprimiendo el desarrollo de las yemas (ver Introducción; McSteen *et al.*, 2005; Bennet *et al.*, 2006). Los mutantes *max* afectan de forma bastante específica al desarrollo de las yemas axilares y presentan un fenotipo más ramificado. Para determinar la relación de *BRC1* con los genes *MAX* generamos dobles mutantes *brc1 max* y comparamos su patrón de ramificación con el de las plantas parentales (Fig. 15). No generamos el doble mutante *brc1-1 max3* puesto que no era posible genotipar el mutante *max3*.

Los dobles mutantes *brc1-1 max* no se diferencian significativamente de los parentales salvo en el caso de *brc1-1 max2-1*. Esto es debido posiblemente a que el mutante *max2-1* tiene afectado el tiempo de floración y más hojas de roseta, por lo que tiene más yemas axilares que pueden generar ramas.

También determinamos los niveles del ARNm de los genes *BRC* en los mutantes *max* (Figs. 15D, E). Observamos que en todos los mutantes *max* los niveles de *BRC1* están muy reducidos, mientras que los de *BRC2* no varían. Este resultado no es comparable al que observamos con el mutante *las* (Fig. 14C) ya que en los mutantes *max* sí se forman yemas axilares.



**Figura 15.** Relación de *BRC1* con la ruta MAX. A) Número de ramas RI en las plantas silvestres, *brc1-1*, *max1-1* y *brc1-1 max1-1*. B) Número de ramas RI en plantas silvestres, *brc1-1*, *max2-1* y *brc1-1 max2-1*. C) Número de ramas de roseta RI en plantas silvestres, *brc1-1*, *max4-1* y *brc1-1 max4-1*. n=11-25. D) Niveles de expresión de *BRC1* en mutantes *max* relativos a los de *ACTINA8*. E) Niveles de expresión de *BRC2* en los mismos mutantes.

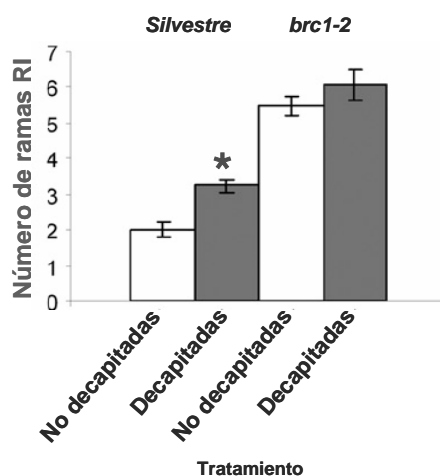
Del análisis de dobles mutantes *brc1 max* podemos deducir que *BRC1* y los genes MAX podrían estar en la misma ruta. Además, los niveles de *BRC1* en los mutantes *max* están muy reducidos, lo que indicaría que estos genes afectan a los niveles de transcripción de *BRC1*. Por tanto el fenotipo de exceso de ramificación de los mutantes *max* podría ser debido a una reducción drástica de la actividad *BRC1* en las yemas axilares.

## 1.6. Relación de *BRC1* con hormonas que controlan la ramificación

### a) Relación de *BRC1* con la señalización por auxinas

Las auxinas sintetizadas en el ápice de la planta inhiben el crecimiento de las yemas axilares y son responsables del fenómeno de la dominancia apical. Cuando las plantas se decapitan, se elimina la fuente de auxinas y algunas de sus yemas laterales elongan.

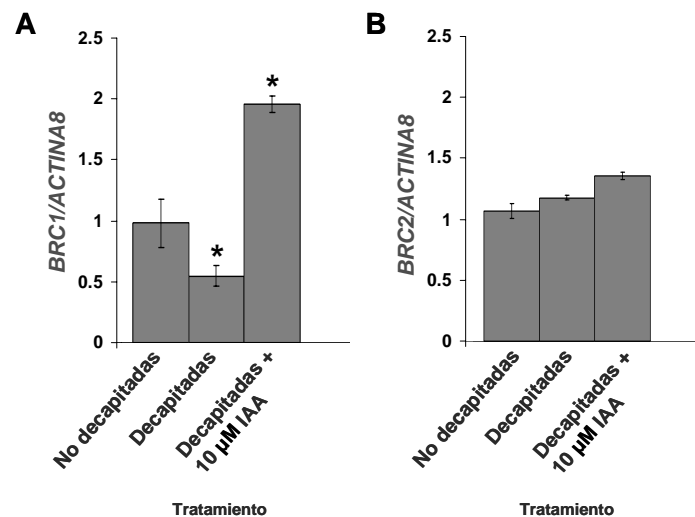
Para determinar si *BRC1* está implicado en la inhibición axilar debida a la dominancia apical realizamos un ensayo de decapitación. Para ello crecimos plantas silvestres y mutantes hasta la elongación de la inflorescencia principal y entonces decapitamos la mitad de ellas. Diez días después, cuantificamos el número de ramas RI de todas las plantas (Fig. 16). Las plantas silvestres responden a la decapitación produciendo más ramas que las no decapitadas. Sin embargo, las plantas mutantes decapitadas tienen el mismo número de ramas que las no decapitadas (Fig. 16). Esto indica que *BRC1* podría participar en la respuesta al fenómeno de la dominancia apical.



**Figura 16.** Ensayo de decapitación en *Arabidopsis*. Cuantificación del número de ramas RI 10 días después de la decapitación.

A continuación estudiamos si en plantas silvestres la elongación de ramas posterior a la decapitación iba acompañada de una regulación negativa de *BRC1*. Observamos una reducción de los niveles de ARNm en estas plantas 1 h después de la decapitación y que alcanzaba un mínimo a las 24 h (Aguilar-Martínez *et al.*, 2007).

Está descrito que la aplicación de auxinas en ápices de plantas decapitadas restaura la dominancia apical (Thimann y Skoog, 1933). Aplicamos la auxina IAA a ápices de plantas decapitadas para estudiar cómo afectaba este tratamiento a los niveles de expresión de *BRC1* y estudiamos su efecto a las 24 h. Observamos que la aplicación de auxinas eleva sus niveles (Fig. 17).

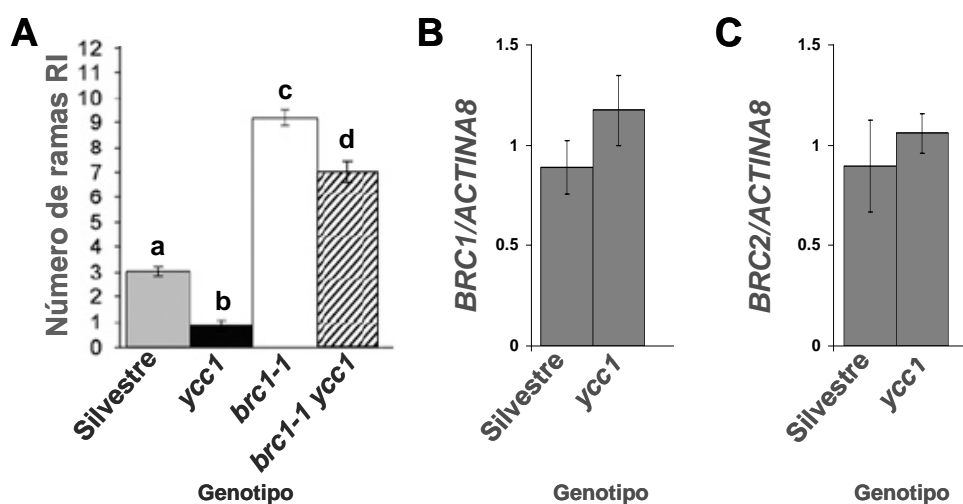


**Figura 17.** A) Niveles de expresión de *BRC1* en plantas no decapitadas, decapitadas sin tratar y decapitadas tratadas con IAA 10 µM durante 24 h. B) Niveles de expresión de *BRC2* en las mismas plantas. Niveles de ARNm relativos a *ACTINA8*.

Estos resultados sugieren que las auxinas podrían controlar la expresión de *BRC1* y que éste a su vez sería el responsable de la respuesta de la dominancia apical.

Para estudiar más a fondo la relación entre las auxinas y *BRC1* estudiamos su interacción con el mutante *yucca1* (*ycc1*) que tiene un contenido de auxinas anormalmente elevado. Uno de los fenotipos asociados a este exceso de auxinas es que las plantas tienen la mayor parte de sus yemas axilares inhibidas o durmientes (Fig. 18A; Zhao *et al.*, 2001). Generamos el doble mutante *brc1-1 ycc1* y comparamos el número de ramas RI con el de los parentales. El doble mutante produce casi tantas ramas RI como el mutante *brc1-1* (Fig. 18A), lo que sugiere que *BRC1* podría ser necesario para mediar el control de la dominancia apical inducido por auxinas.

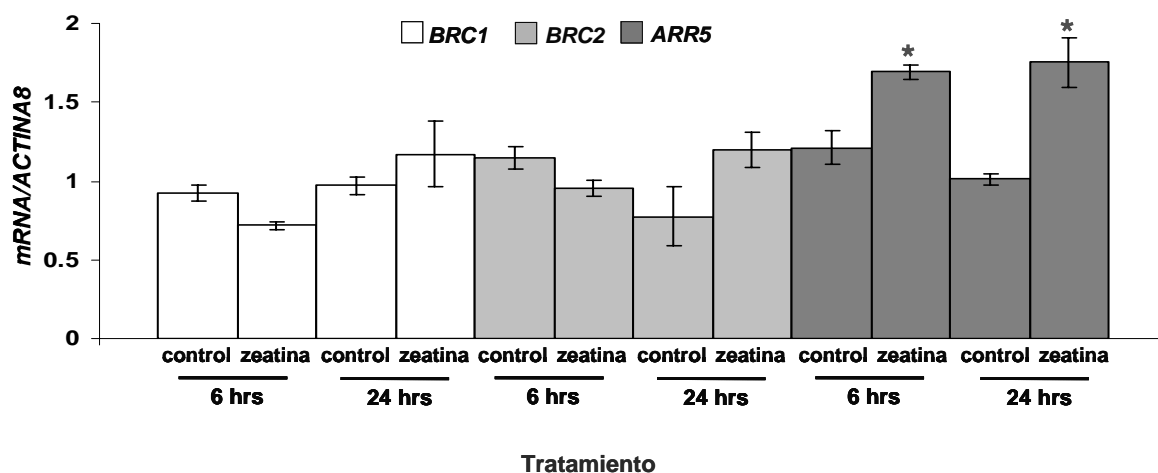
Además determinamos los niveles de *BRC1* y de *BRC2* en el mutante *ycc1* y observamos que estos son ligeramente mayores en las plantas silvestres aunque no de forma significativa (Figs. 18B, C).



**Figura 18.** A) Número de ramas RI en plantas silvestres, *ycc1*, *brc1-1* y *ycc1 brc1-1*. n=15-20. B) Niveles de expresión de *BRC1* en el mutante *ycc1* comparados con los del silvestre. C) Niveles de expresión de *BRC2* en el mismo mutante. Niveles de ARNm relativos a *ACTINA8*.

### 1.5.2. Relación de *BRC1* con las citoquininas

Las citoquininas tienen una función antagonista a la de *BRC1*: promueven la iniciación y el desarrollo de los meristemos axilares, el crecimiento de las yemas y la elongación de ramas (Cline, 1991). Para estudiar la relación de *BRC1* con esta hormona realizamos ensayos de respuesta de *BRC1* a la aplicación de citoquininas (Fig. 19). Pulverizamos con zeatina yemas axilares de plantas que estaban iniciando la elongación de la inflorescencia principal y determinamos los niveles de ARNm de *BRC1* y *BRC2* a las 6 y a las 24 h posteriores a la aplicación. No observamos diferencias significativas en los niveles de *BRC1* y *BRC2* entre plantas tratadas y sin tratar (Fig. 19). Esto no es debido a que el tratamiento no fue eficaz ya que el gen *ARR5* (At3g48100; Kiba *et al.*, 2005) utilizado como control de la respuesta a citoquininas respondió al tratamiento a las 6 y 24 h (Fig. 19).

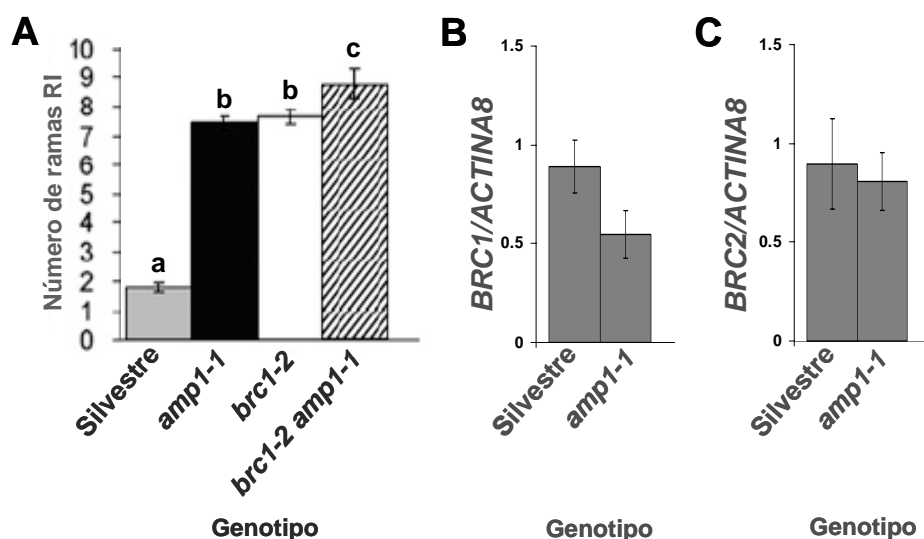


**Figura 19.** Niveles de expresión de *BRC1*, *BRC2* y *ARR5* en plantas sin tratar (control) y tratadas con zeatina 10  $\mu$ M, a las 6 y 24 h de la aplicación. Niveles de ARNm relativos a *ACTINA8*.

También analizamos el mutante *altered meristem program1-1* (*amp1-1*), en el que la tasa de síntesis de citoquininas es cinco veces mayor que en las plantas silvestres (Nogué *et al.*, 2000). Un fenotipo asociado a estos altos niveles de citoquininas es un exceso de iniciación de meristemos axilares y de elongación de ramas en comparación con las plantas silvestres. Generamos el doble mutante *amp1-1 brc1-2* y estudiamos su patrón de ramificación. Observamos que el número de ramas RI era ligeramente mayor en el doble mutante que en los parentales, aunque no de forma significativa (Fig. 20A).

Por otro lado los niveles de ARNm de *BRC1* y *BRC2* en el mutante *amp1-1* son menores que en el silvestre, aunque tampoco de forma significativa (Figs. 20B-C).

De los resultados anteriores podemos deducir que aunque no se puede descartar que *amp1-1* y *brc1* actúen en una misma ruta (Fig. 20A), las citoquininas no parecen controlar los niveles de transcripción de *BRC1* (Figs. 19 y 20B).



**Figura 20.** A) Número de ramas de roseta RI en plantas silvestres, mutantes *amp1-1*, *brc1-2* y *amp1-1 brc1-2*. n=19-21. B) Niveles de expresión de *BRC1* en el mutante *amp1-1* en comparación con las plantas silvestres. Niveles de ARNm relativos a *ACTINA8*. C) Niveles de expresión de *BRC2* en el mismo mutante.

## 1.7. Relación de *BRC1* en con estímulos ambientales que suprimen la ramificación

### a) Relación de *BRC1* con la respuesta de huída de la sombra

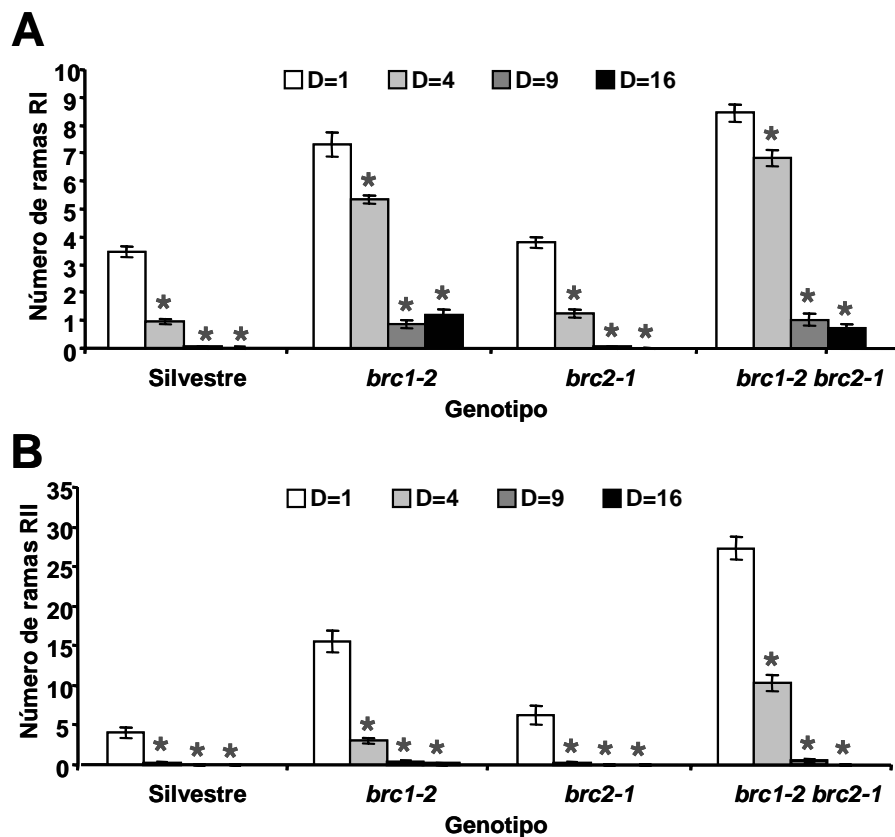
Cuando las plantas crecen en alta densidad, la razón luz roja:luz roja lejana (R:RL) que perciben disminuye. Esto desencadena una respuesta de huída de la sombra, una de cuyas características es la inhibición de las yemas laterales y supresión de la ramificación. Este mismo tipo de respuesta se observa en plantas crecidas a baja densidad suplementadas con luz infrarroja (Smith y Whitelam, 1977).

Para estudiar el posible papel de *BRC1* y *BRC2* en esta respuesta, crecimos plantas silvestres y mutantes *brc* en distintas densidades de plantación y determinamos sus patrones de ramificación (Fig. 21). En general tanto las plantas silvestres como las mutantes desarrollan menos ramas laterales a mayores densidades de plantación. Sin embargo en mutantes *brc1-2* la respuesta es menor que en plantas silvestres. Por ejemplo, en plantas silvestres la reducción en el número de ramas RI a densidad de 4 plantas por alvéolo respecto a la densidad control es del 71.8% (Fig. 21A). En *brc1-2* esta reducción sólo es del 27.1%. Además, mientras que en las plantas silvestres crecidas a densidades de 9 o 16 plantas por alvéolo no elonga ninguna rama RI, en plantas *brc1-2* se forman 1-2 ramas en estas condiciones y no hay una respuesta diferente en estas dos densidades. Esto indica que los mutantes *brc1* son parcialmente insensibles al crecimiento a alta densidad. El comportamiento de *brc2-1* es similar al de las plantas silvestres, y el del doble mutante, similar al de *brc1-2* (Fig. 21), lo que indica que *BRC2* no participa en esta respuesta.

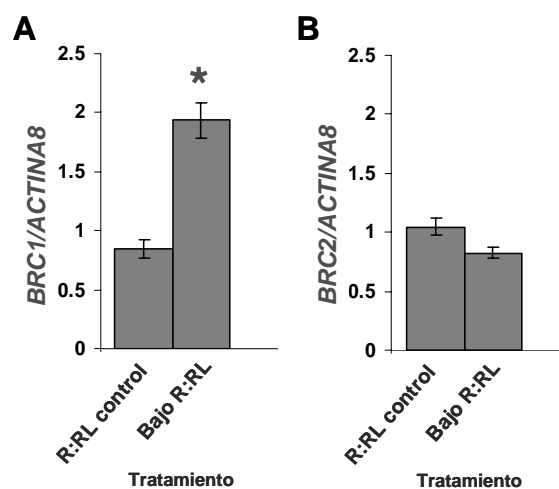
En nuestro laboratorio se estudiaron los niveles de *BRC1* y de *BRC2* en dos de estas condiciones: densidad baja (1 planta/alvéolo) y densidad alta (9 plantas/alvéolo). Se encontró que *BRC1* pero no *BRC2* estaba sobreexpresado en plantas crecidas a alta densidad (Aguilar-Martínez *et al.*, 2007). Esta respuesta podría reflejar una regulación positiva de *BRC1* por niveles bajos de R:FR. Para estudiar este punto crecimos plantas



silvestres durante 10 h en condiciones de bajo ratio R:RL (0.10) y otras en condiciones control y determinamos los niveles de expresión de *BRC1* (Fig. 22). Observamos que en las plantas mantenidas en condiciones de bajo R:RL los niveles de expresión de *BRC1* eran más altos que en las crecidas en condiciones control.

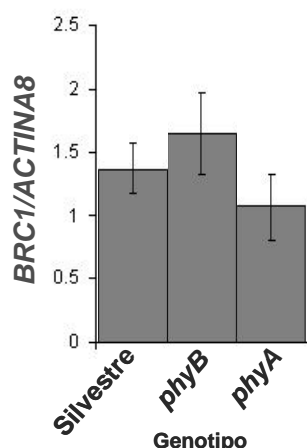


**Figura 21.** Fenotipo de ramificación en plantas crecidas a densidades de plantación (D) de 1, 4, 9 y 16 plantas por alvéolo. A) Número de ramas RI en plantas silvestres, mutantes *brc1-2*, *brc2-1* y doble mutante *brc1-2 brc2-1*. B) Número de ramas RII en las mismas plantas. n=15-32.



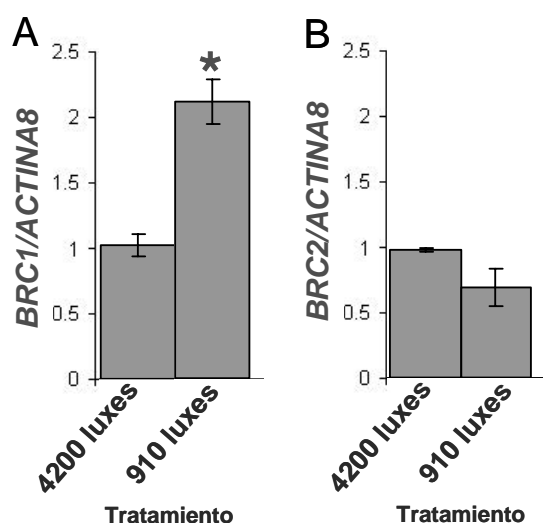
**Figura 22.** A) Niveles de expresión de *BRC1* en plantas con inflorescencia principal al inicio de la elongación crecidas durante 10 h en bajo R:RL o en condiciones control. B) Niveles de expresión de *BRC2* en las mismas plantas. Niveles de ARNm relativos a *ACTINA8*.

En plantas las variaciones en la razón R:RL son detectadas por los fitocromos. En *Arabidopsis* *PHYB* tiene un papel central en esta detección (Whitelam y Smith, 1991), mientras que *PHYA* parece antagonizar su función (Franklin y Whitelam, 2005). Estudiamos si los niveles de expresión de *BRC1* estaban afectados en los mutantes *phyB* y *phyA* en condiciones de crecimiento estandar. Observamos que la expresión de *BRC1* es semejante en plantas silvestres y en los mutantes *phyB* y *phyA* (Fig. 23). Aunque estos fitocromos son los más importantes se han descrito tres más en *Arabidopsis* (*PHYC*, *PHYD* y *PHYE*; Devlin *et al.*, 1999) y no descartamos que tengan, individualmente o en combinación un papel en este proceso. En la actualidad en el laboratorio se está realizando este mismo experimento a alta densidad y tras exposición a un bajo R:RL.



**Figura 23.** Niveles de expresión de *BRC1* en plantas silvestres y en mutantes *phyB* y *phyA*. Niveles de ARNm relativos a *ACTINA8*.

Por otro lado se ha descrito que una disminución en la intensidad de luz sin alterar su calidad provoca una supresión de la ramificación (Casal *et al.*, 1986; Gautier *et al.*, 1999). Para determinar el efecto que producen sobre la expresión de *BRC1* y *BRC2* distintos grados de intensidad de luz crecimos plantas silvestres a dos intensidades lumínicas: 910 luxes y 4200 luxes (condiciones estandar) durante 24 h y analizamos los niveles de expresión de estos genes (Fig. 24). Observamos que en baja intensidad de luz los niveles de *BRC1* pero no los de *BRC2* aumentan significativamente respecto al control.

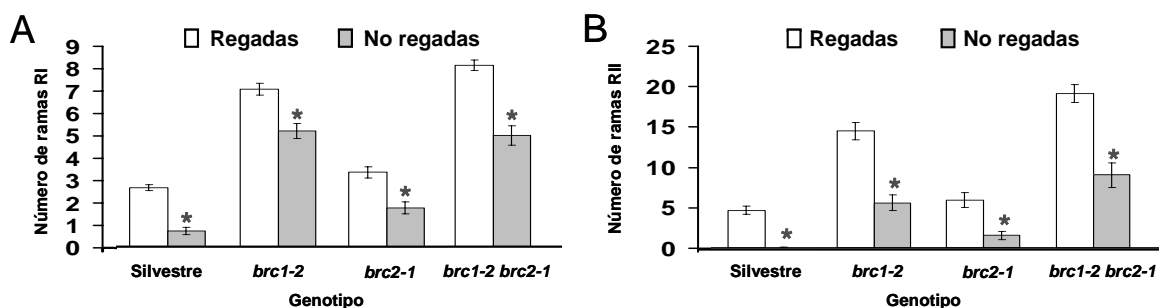


**Figura 24.** A) Niveles de expresión de *BRC1* en plantas al inicio de la elongación de la inflorescencia principal crecidas durante 24 h en condiciones de baja intensidad de luz. B) Niveles de expresión de *BRC2* en las mismas plantas. Niveles de ARNm relativos a *ACTINA8*.

De los resultados anteriores podemos concluir que *BRC1* parece responder en un plazo relativamente corto a variaciones en las condiciones de iluminación de las plantas.

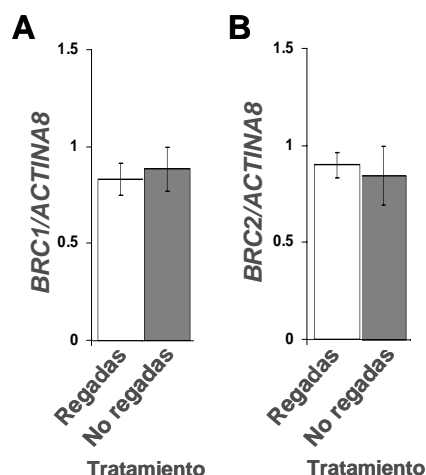
### b) Relación de *BRC1* con la respuesta al déficit hídrico

Las plantas crecidas en condiciones de déficit hídrico producen menos ramas (ver Introducción). Para determinar si los genes *BRC* median esta respuesta estudiamos en condiciones sequía el patrón de ramificación de plantas silvestres, mutantes *brc1*, *brc2* y el doble *brc1 brc2* (Fig. 25). Observamos que en estas condiciones el número de ramas RI es menor en todos los genotipos (Fig. 25A). Sin embargo, mientras que en plantas silvestres la disminución del número de ramas es del 73.5%, en el mutante *brc1-2* es sólo del 26.6%, del 47.9% en *brc2-1* y del 38.9% en el doble *brc1-2 brc2-1*. De forma semejante, la disminución en el número de ramas RII es mayor en las plantas silvestres (81.4%) y en el mutante *brc2-1* (74.2%) que en *brc1-2* (61.5%) o el doble mutante *brc1-2 brc2-1* (52.9%; Fig. 25B). Por tanto los mutantes *brc1-2* parecen ser parcialmente insensibles al déficit hídrico.



**Figura 25.** Fenotipo de ramificación de plantas crecidas en condiciones de tempero (regadas) o crecidas en déficit hídrico (no regadas). **A)** Número de ramas RI en plantas silvestres, en los alelos mutantes *brc1-2* y *brc2-1* y en el doble *brc1-2 brc2-1*. **B)** Número de ramas RII en las mismas plantas. n=20-27.

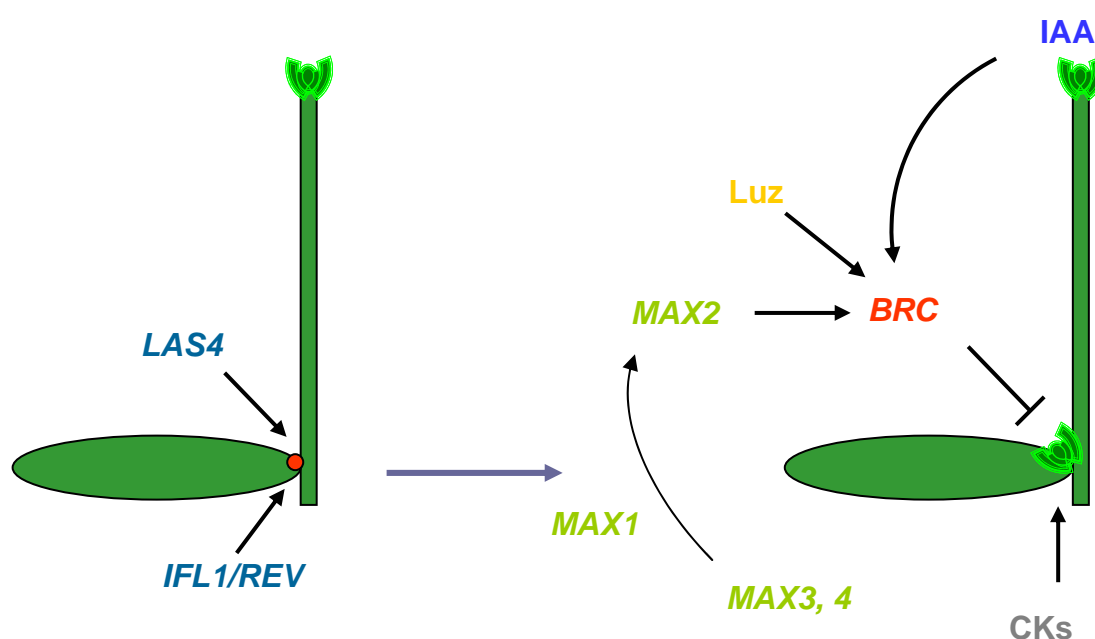
Por otro lado determinamos los niveles de transcripción de los genes *BRC* en condiciones de déficit hídrico y no observamos diferencias a nivel transcripcional entre plantas regadas y plantas sometidas a déficit hídrico (Fig. 26).



**Figura 26.** **A)** Niveles de expresión de *BRC1* en plantas silvestres en condiciones de tempero (regadas) y de déficit hídrico (no regadas). **B)** Niveles de expresión de *BRC2* en las mismas plantas. Niveles de ARNm relativos a *ACTINA8*.

De los resultados presentados hasta ahora podemos proponer el siguiente modelo sobre la función de *BRC1* (Fig. 27). *BRC1*, un gen que se expresa en meristemos y yemas axilares, codifica para una proteína nuclear (Fig. 7) que posiblemente actúa como factor de transcripción. Este proteína causa un retraso o arresto del crecimiento de los tejidos donde se expresa (Fig. 8). En plantas silvestres, su acción localizada en yemas axilares provoca un arresto del desarrollo de las yemas e impide o retrasa la elongación de las ramas de roseta (Figs. 10 y 11). Durante el desarrollo axilar, *BRC1* actúa después de *LAS* e *IFL1*, genes necesarios para la iniciación de los meristemos axilares. No está claro que estos genes controlen *BRC1* a nivel transcripcional (Fig. 14). Por el contrario, la ruta MAX, implicada en la supresión de la ramificación, controla positivamente los niveles del ARNm de *BRC1* y posiblemente actúa a través de este gen para llevar a cabo su función (Fig. 15). Los niveles del ARNm de *BRC1* responden a estímulos endógenos (dominancia apical) y ambientales (calidad y cantidad de luz) que controlan la ramificación y *BRC1* es necesario para la respuesta a estos estímulos (Figs. 16, 22 y 24). Además, *BRC1* responde transcripcionalmente a la acción de las auxinas, mediadoras de la dominancia apical (Fig. 17) pero no a la acción de las citoquininas, con actividad antagónica a la de *BRC1* y que posiblemente actúan a través de una ruta independiente (Fig. 19).

Por todo ello proponemos que el gen *BRC1* es un interruptor local del crecimiento axilar. Este gen integra la respuesta a señales endógenas y ambientales que suprimen la ramificación y las traduce en un arresto del desarrollo de las yemas (Aguilar-Martínez *et al.* 2007).



**Figura 27.** Control genético, hormonal y ambiental de *BRC1*. *LAS4* e *IFL1/REV* actúan por encima de *BRC1* en las etapas iniciales de la formación de las yemas axilares. *BRC1* actúa reprimiendo el desarrollo de las yemas axilares. *BRC1* está en la ruta de los genes MAX y estos controlan su expresión. *BRC1* puede mediar en el fenómeno de la dominancia apical ya que las auxinas (*IAA*) producidas en la zona apical activan su expresión. Las citoquininas (*CKs*) promueven el desarrollo de las yemas axilares de forma independiente a la acción de *BRC1*. Las condiciones ambientales de iluminación determinan el desarrollo de las yemas axilares a través de la acción de *BRC1*.

## 2. Análisis del promotor de *BRC1*

Nuestra hipótesis de trabajo es que los cambios transcripcionales en *BRC1* descritos en el apartado anterior están controlados por regiones reguladoras localizadas en el promotor de *BRC1*. Para identificar esas regiones y entender cómo afectan a la transcripción de *BRC1* realizamos un análisis del promotor de *BRC1*. También realizamos un análisis del promotor de *BRC2*, del que hablaremos en un apartado específico.

### 2.1. Construcción $\Delta^{1.7}$ p*BRC1::GUS*

#### a) Patrón de expresión

Como punto de partida fusionamos 1762 pb de la región 5' de *BRC1* (que incluye la región 5'UTR) al gen delator  $\beta$ -Glucuronidasa (*GUS*) en el plásmido binario pGWB3 y generamos la construcción  $\Delta^{1.7}$ p*BRC1::GUS* (Fig. 28A). Obtuvimos líneas transgénicas T3 homocigotas con una única inserción y estudiamos el patrón de expresión del gen *GUS*. Observamos una expresión similar a la de *BRC1* en todas las etapas del desarrollo de las yemas axilares excepto en meristemos axilares (Figs. 28B-E).

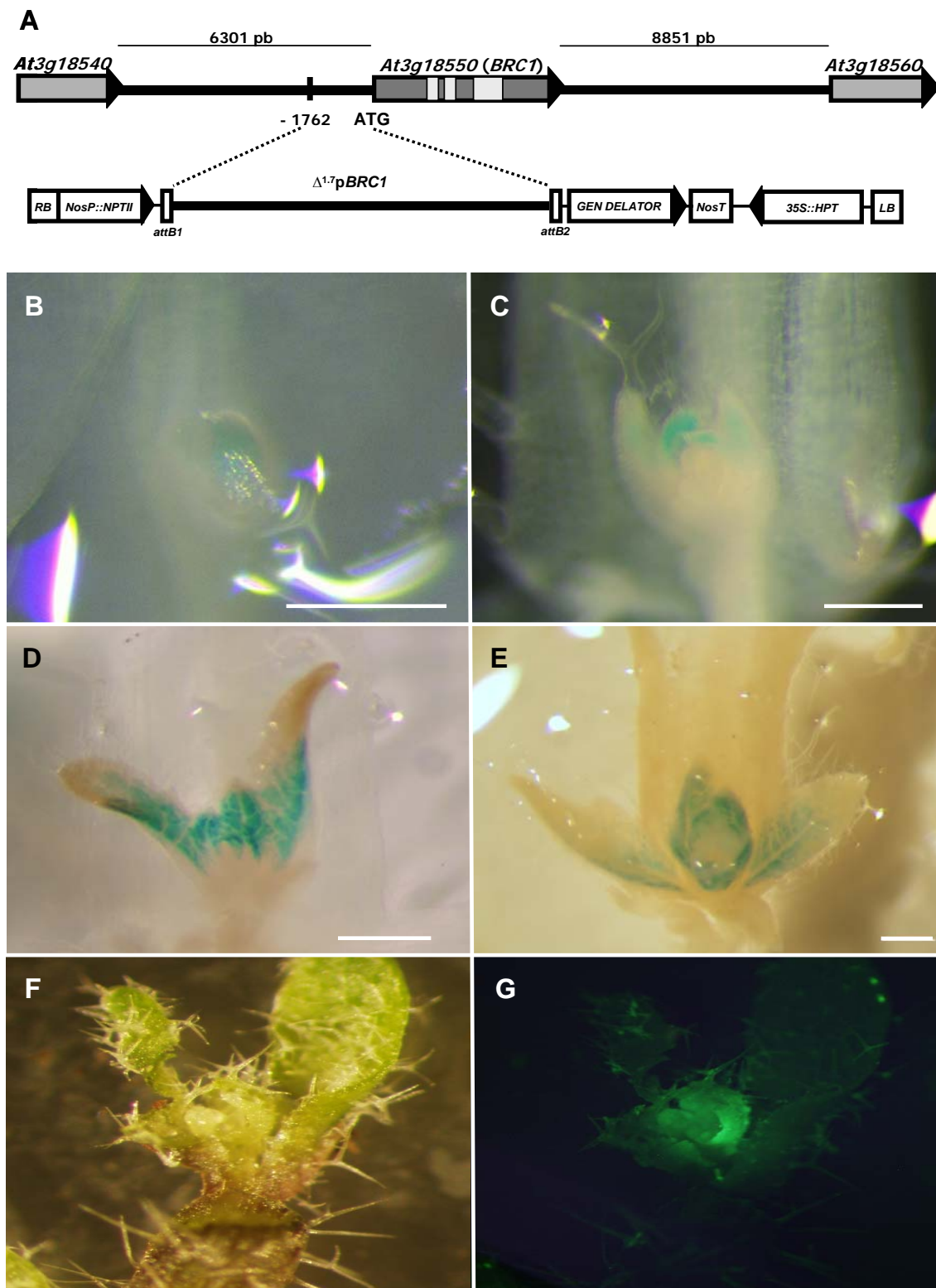
También fusionamos el fragmento de 1.7 Kb a la secuencia codificante de la proteína fluorescente verde (*GFP*) en el plásmido binario pGWB4 (Fig. 28A) y generamos líneas transgénicas con la construcción  $\Delta^{1.7}$ p*BRC1::GFP*. En estas líneas observamos un patrón de distribución de la proteína GFP similar al de *GUS* (Figs. 28F,G). Sin embargo los bajos niveles de expresión de la proteína GFP en yemas axilares hacen muy difícil su monitorización *in vivo* por lo que escogimos el sistema *GUS* para posteriores análisis.

#### b) Respuesta a condiciones que afectan a los niveles del ARNm de *BRC1*

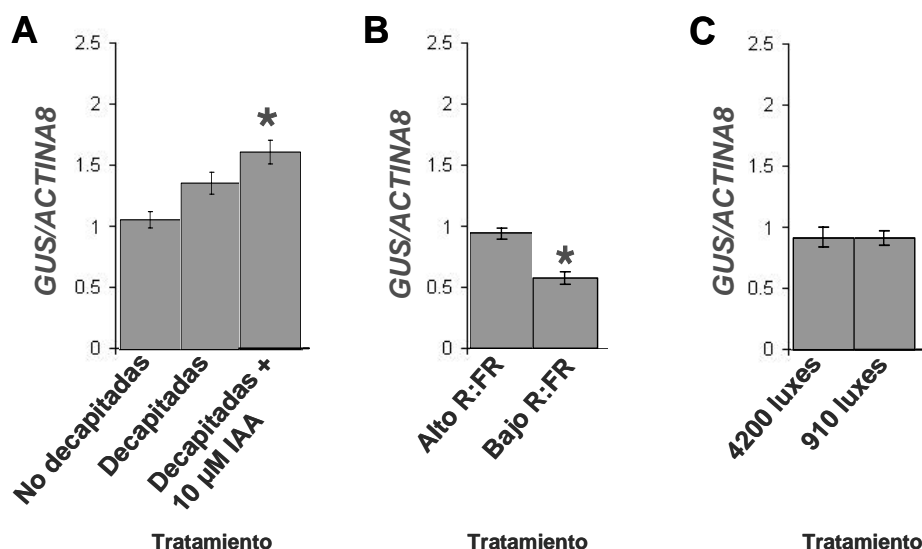
El fragmento de 1.7 Kb parece reproducir la expresión silvestre del gen *BRC1*. Por otro lado hemos descrito una serie de condiciones genéticas, fisiológicas y ambientales que afectan a los niveles del ARNm de *BRC1*. Por tanto estudiamos si el fragmento de 1.7 Kb respondía de forma similar al promotor del gen *BRC1*. Para medir directamente la actividad transcripcional del fragmento 1.7 Kb analizamos los niveles del ARNm de *GUS* y los comparamos con los de *BRC1*.

Aplicamos auxinas a plantas decapitadas al iniciar la elongación de la inflorescencia principal y analizamos los niveles del ARNm de *GUS* a las 24 h de la forma descrita para la Figura 17. Determinamos que, como ocurre con el gen *BRC1*, en las plantas tratadas con auxinas los niveles del ARNm de *GUS* son más elevados que en las plantas control (Fig. 29A). Esto indica que la zona reguladora responsable de la respuesta a auxinas se encuentra en esta región de 1.7 Kb. Sin embargo en las plantas decapitadas no tratadas no observamos una bajada del nivel de expresión de *GUS* como el que encontramos en *BRC1*. Esto puede ser debido a que la estabilidad del ARNm es mayor que la del de *BRC1*.

Por otra parte al poner estas plantas en luz enriquecida en rojo lejano (Fig. 29B) o en baja intensidad de luz (Fig. 29C) no observamos un aumento de la expresión de *GUS* como el que encontramos en el caso de *BRC1* (Figs. 22 y 24). Esto puede indicar que los elementos de respuesta a estas condiciones de luz no están en las 1.7 Kb analizadas o bien que las diferencias se deben a una regulación post-transcripcional que afecta a la estabilidad del ARNm.



**Figura 28.** Promotor de *BRC1*. **A)** Esquemas (no a escala) de la región genómica de *BRC1* y de la construcción inicial  $\Delta^{1.7}pBRC1::GUS$  clonada en el plásmido binario pGWB3, y  $\Delta^{1.7}pBRC1::GFP$  clonada en pGWB4. Ambas se construyeron mediante el sistema Gateway®. **B-E)** Patrón de expresión de GUS de  $\Delta^{1.7}pBRC1::GUS$  en yemas axilares de *Arabidopsis*. **B)** Fase de primordio de hoja. **C)** Estadio vegetativo 2. **D)** Estadio vegetativo 3. **E)** Estadio reproductivo, según Fig. 3. **F)** Yema axilar de líneas  $\Delta^{1.7}pBRC1::GFP$  visualizada con luz visible. **G)** Misma yema que en **F)** pero observada con luz ultravioleta. RB (right border) y LB (left border), extremos del transgén; gen delator *GUS* o *GFP*; *NosT*, terminador de Nopalina sintetas; *attB1* y *attB2*, sitios de recombinación del casete Gateway® y genes de resistencia a Kanamicina (*NosP::NPTII*) e Higromicina (*35S::HPT*). Barras de escala = 200  $\mu$ m en **B)** y **C)**, 500  $\mu$ m en **D)** y **E)**.



**Figura 29.** Niveles del ARNm de *GUS* en plantas  $\Delta^{1.7}$ p*BRC1::GUS*. **A)** Experimento de decapitación similar al de la Fig. 17. **B)** Tras exposición a distintas calidades de luz como en la Fig. 27. **C)** En distintas intensidades de luz como en la Fig. 24. Niveles del ARNm relativos a *ACTINA8*.

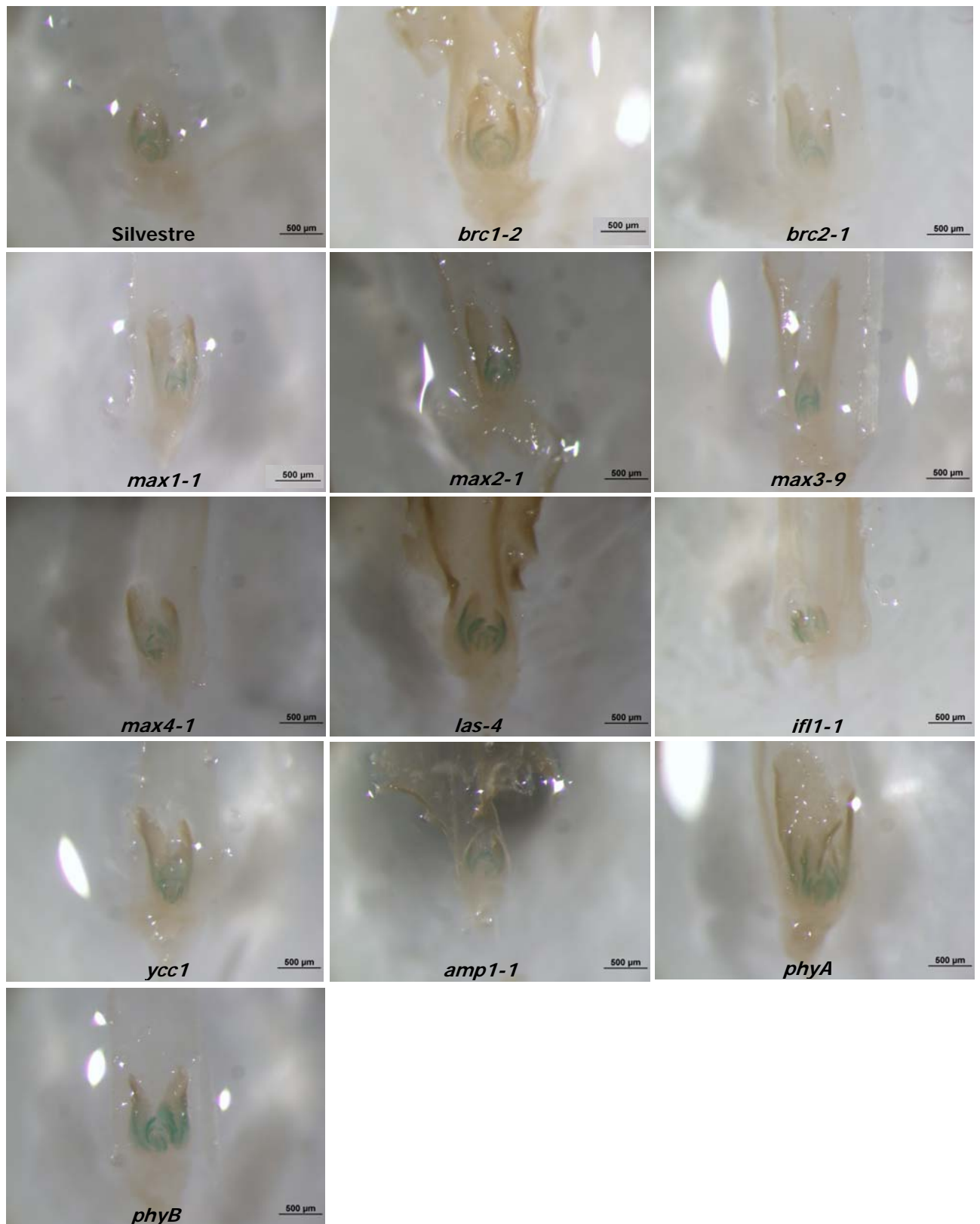
También combinamos los mutantes de ramificación estudiados con plantas  $\Delta^{1.7}$ p*BRC1::GUS*. En estas plantas realizamos tinciones GUS de yemas axilares (Fig. 30) y determinamos los niveles del ARNm de *GUS* en las mismas (Fig. 31).

Los niveles del ARNm del *GUS* en el mutante *las4* están reducidos respecto del silvestre, de la misma forma que los niveles de *BRC1* (Fig. 14). En los fondos *ifl1*, *ycc1*, *phyA* y *phyB* los niveles de *GUS* son similares a los del silvestre, como ya encontramos analizando el ARNm de *BRC1* (Figs. 14, 18 y 23).

Sin embargo en los mutantes *max* encontramos una gran diferencia entre lo observado con el ARNm de *BRC1* y con el ARNm de *GUS*: mientras que los niveles de *BRC1* están muy reducidos (Fig. 15) los de *GUS* son comparables a los de las plantas silvestres (Figs. 30 y 31). Esto podría indicar que los genes *MAX* afectan a la estabilidad del ARNm de *BRC1* en lugar de a su transcripción.

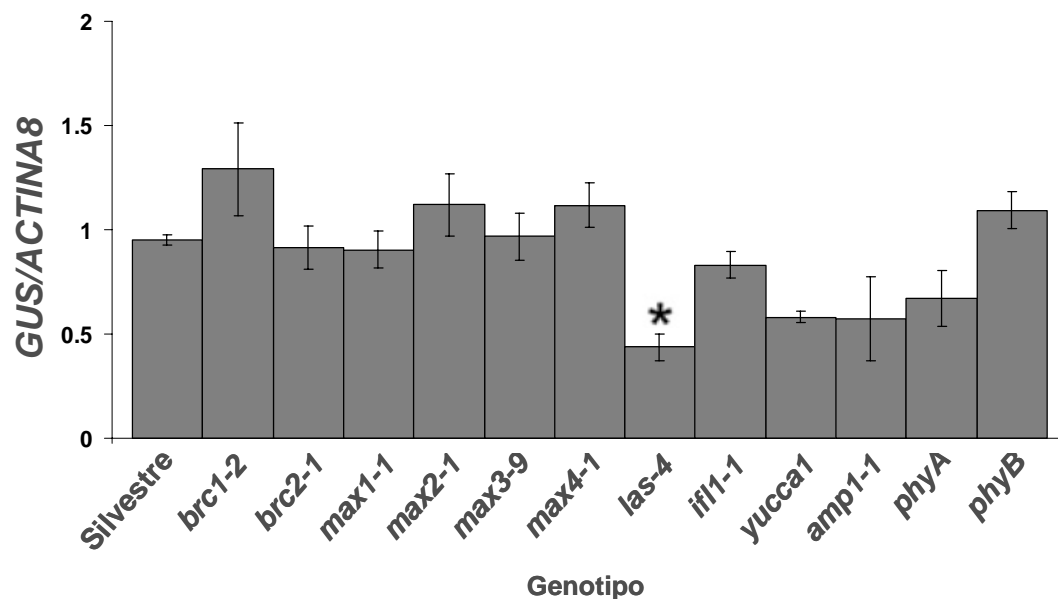
## 2.2. Análisis de delección del promotor de *BRC1*

Para identificar las regiones reguladoras necesarias para la expresión de *BRC1* en yemas axilares iniciamos un análisis de delección del promotor de *BRC1*. Para ello partimos de la construcción inicial  $\Delta^{1.7}$ p*BRC1::GUS* y realizamos fusiones a *GUS* de fragmentos cada vez más pequeños. Para elegir el tamaño de los fragmentos analizamos previamente el grado de polimorfismo de esta región en varios ecotipos de *Arabidopsis* (C24, *Ler*, *Ws*, *Sha* y *LL-0* además de *Columbia*). El objetivo era identificar regiones particularmente conservadas que pudieran ser imprescindibles para la actividad transcripcional de *BRC1* y regiones más polimórficas que pudieran reflejar regiones irrelevantes para la regulación del gen. Excepto C24, que es ligeramente más ramificado que *Columbia*, el grado de dominancia apical del resto de los ecotipos es comparable.



**Figura 30.** Actividad GUS en yemas axilares de líneas con la construcción  $\Delta^{17}\text{pBRC1}::\text{GUS}$  en plantas silvestres y en mutantes con ramificación alterada.





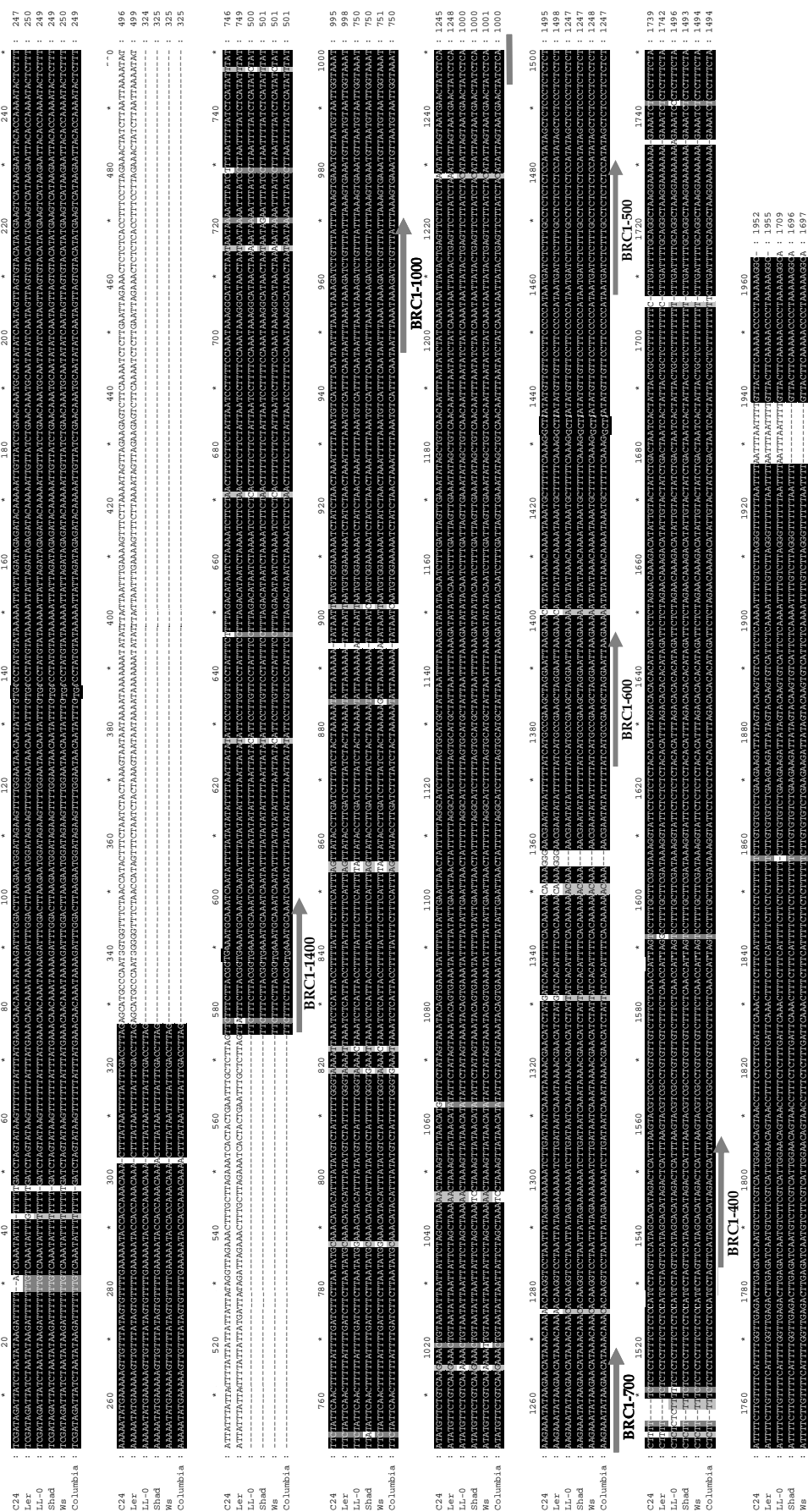
**Figura 31.** Niveles de expresión de *GUS* en plantas silvestres y en varios mutantes relacionados con el proceso de ramificación. Niveles de ARNm relativos a *ACTINA8*.

Amplificamos esta región genómica en los distintos ecotipos mediante PCR, los secuenciamos y comparamos sus secuencias. En general, el grado de polimorfismo es muy bajo. Entre los polimorfismos encontrados, destaca un *indel* de 11 pb a 25 pb del ATG y otro de 248 pb a 1371 pb del ATG (Fig. 32). En ambos casos el ecotipo Columbia presenta una delección en estas posiciones.

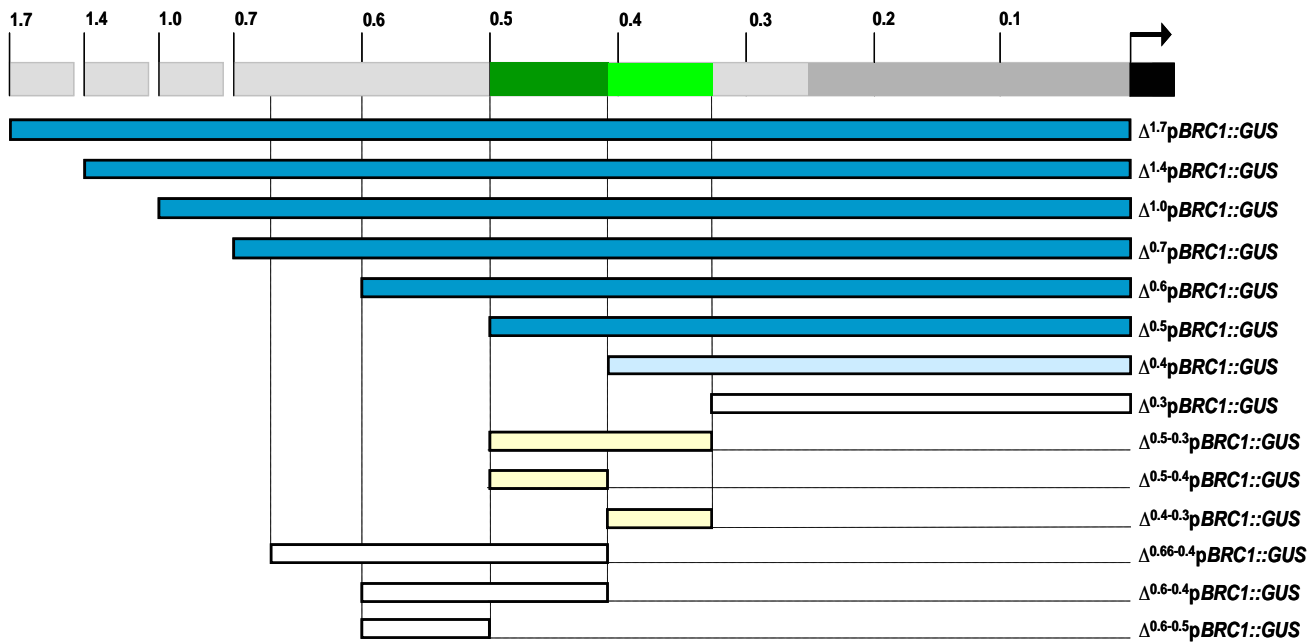
Basándonos en esta comparación de secuencias diseñamos cebadores y realizamos fusiones a *GUS* de fragmentos de 1.4, 1.0, 0.7 y 0.4 Kb y generamos las construcciones  $\Delta^{1.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$ ,  $\Delta^{1.0}\text{pBRC1}::\text{GUS}$ ,  $\Delta^{0.7}\text{pBRC1}::\text{GUS}$  y  $\Delta^{0.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$  respectivamente (Fig. 33). Posteriormente realizamos las construcciones  $\Delta^{0.6}\text{pBRC1}::\text{GUS}$ ,  $\Delta^{0.5}\text{pBRC1}::\text{GUS}$  y  $\Delta^{0.3}\text{pBRC1}::\text{GUS}$  (Tabla 5, Fig. 33).

Teñimos plantas cuya inflorescencia estaba empezando a elongar de las distintas construcciones y determinamos el patrón de distribución de *GUS* (Fig. 34). Observamos que las líneas con fragmentos de 0.5 Kb o mayores fusionados a *GUS* tenían una expresión de *GUS* similar a la de  $\Delta^{1.7}\text{pBRC1}::\text{GUS}$ . En las plantas que llevan la construcción  $\Delta^{0.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$  se observaba una expresión *GUS* normal en yemas caulinares, pero más tenue en las yemas de roseta. En las plantas con la construcción  $\Delta^{0.3}\text{pBRC1}::\text{GUS}$  no se detectó expresión de *GUS* (Figs. 33 y 34). Además cuantificamos los niveles de ARNm de *GUS* de estas líneas y confirmamos la tendencia observada en el análisis cualitativo de las líneas transgénicas (Fig. 35). Debido a una expresión ectópica de *GUS* varias líneas dan valores muy elevados (no mostrado):  $222.3 \pm 18.8$ ,  $336.8 \pm 30.3$  y  $159.9 \pm 20.7$  para la construcción  $\Delta^{1.7}\text{pBRC1}::\text{GUS}$ ,  $101.0 \pm 6.1$  para  $\Delta^{1.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$  y  $159.1 \pm 8.7$  para  $\Delta^{1.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$ , que hemos descartado en nuestro análisis.

De este análisis se puede deducir que entre -504 pb y -337 pb en 5' del ATG hay una región necesaria para la expresión de *BRC1* en yemas axilares.



**Figura 32.** Alineamiento realizado con ClustalW de 1.7 Kb de la región 5' de *BRC1* en los ecotipos Ws, C24, Ll-0, Sha, Ler y Col de Arabidopsis. Bajo el alineamiento se indican los cebadores utilizados para generar las fusiones a *GUS* de fragmentos menores del promotor de *BRC1*.

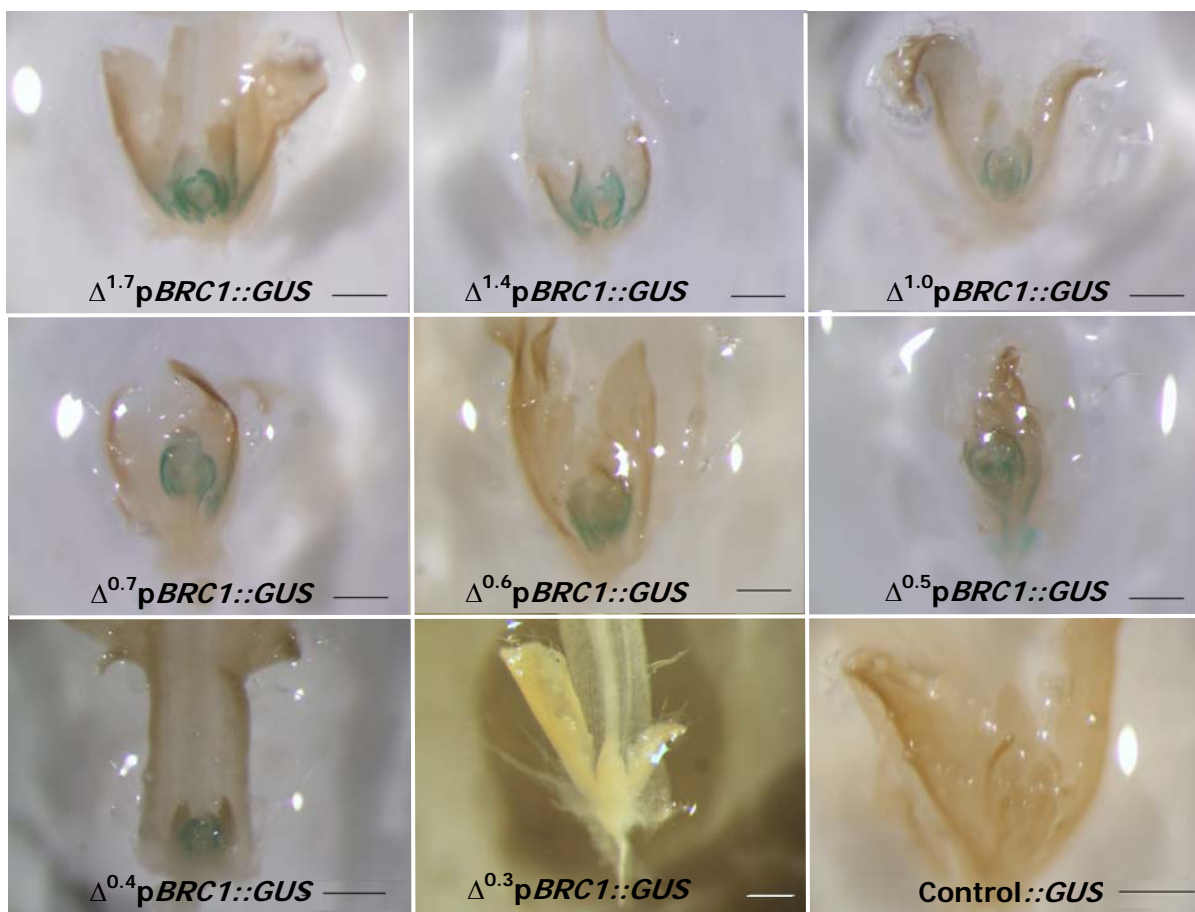


**Figura 33.** Esquema de los fragmentos del promotor de *BRC1* utilizados para realizar las fusiones a *GUS*. La barra superior representa la región 5' de *BRC1* estudiada. En gris oscuro se representa la región 5'UTR (hasta 267 pb), en negro y con flecha, el inicio de la zona codificante. En verdes oscuro y claro, zonas importantes para la regulación de *BRC1*. Las barras inferiores representan las distintas fusiones a *GUS*. En azul oscuro se indica que la tinción *GUS* en yemas es elevada, en azul claro que es tenue, en amarillo claro tinción no determinada en líneas T3 y en blanco ausencia de tinción *GUS*.

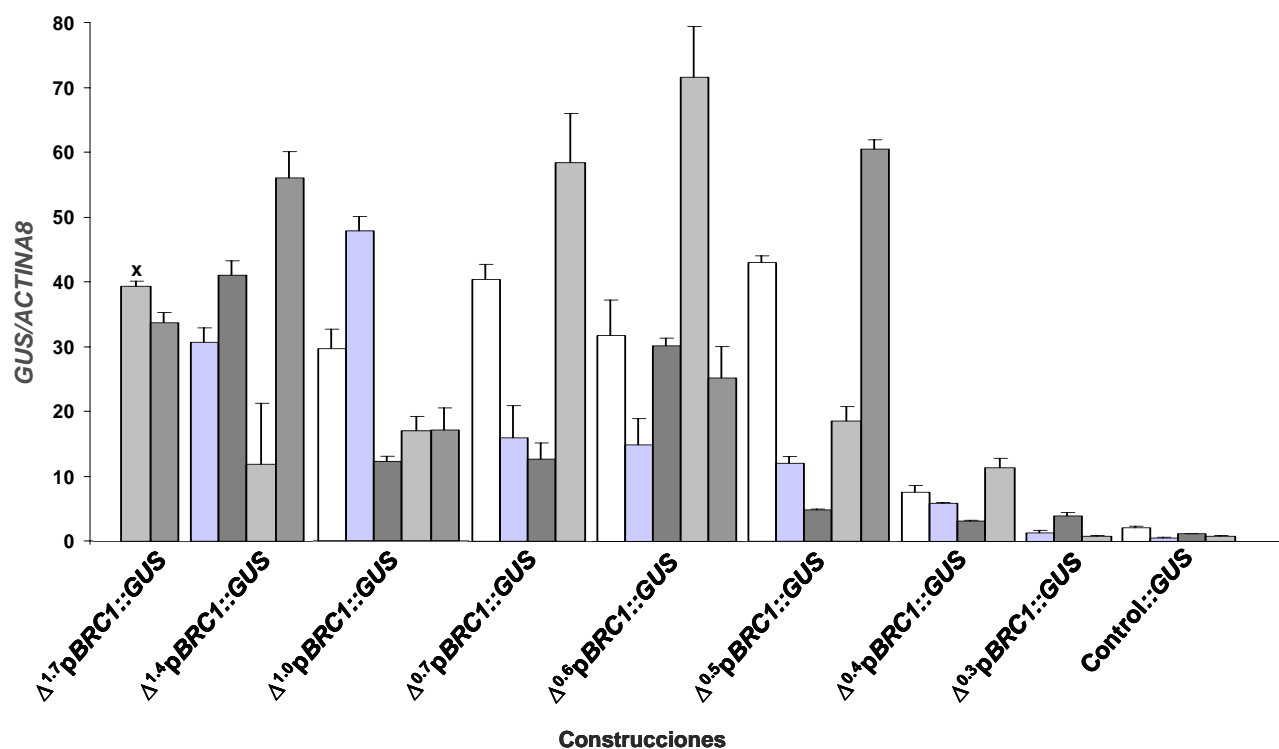
**Tabla 5.** Líneas T1 y T3 generadas de las construcciones con fusiones a *GUS* de fragmentos del promotor de *BRC1* indicadas en la Fig. 33.

Construcción	Nº Líneas T1	Nº Líneas T3
$\Delta^{1.7}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	n.d. <sup>a</sup>	10
$\Delta^{1.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	16	12
$\Delta^{1.0}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	13	7
$\Delta^{0.7}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	19	17
$\Delta^{0.6}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	33	12
$\Delta^{0.5}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	24	18
$\Delta^{0.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	35	30
$\Delta^{0.3}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	18	15
$\Delta^{0.66-0.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	22	11
$\Delta^{0.6-0.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	15	7
$\Delta^{0.6-0.5}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	11	8
$\Delta^{0.5-0.3}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	5	n.d.
$\Delta^{0.5-0.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	10	n.d.
$\Delta^{0.4-0.3}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	13	n.d.
Control:: <i>GUS</i>	18	9

<sup>a</sup> n.d.: no determinado



**Figura 34.** Tinciones GUS de yemas axilares de plantas de líneas T3 representativas de cada construcción indicada. Para la construcción  $\Delta^{0.4}$ pBRC1::GUS se muestra una yema de una hoja caulinar, en yemas de roseta no se detecta expresión. Barra de escala = 500  $\mu$ m.



**Figura 35.** Niveles de expresión de GUS en 2-5 líneas independientes con fragmentos cada vez menores del promotor de BRC1. Niveles de ARNm relativos a ACTINA8. La cruz marca la línea control usada para las Figs. 28 a 31.

Para determinar si esta región era además de necesaria, suficiente para controlar esta expresión, fusionamos el fragmento entre -504 pb y -337 pb a un promotor mínimo pCaMV35S y a *GUS* utilizando el plásmido binario pTi0046 y generamos las líneas  $\Delta^{0.5-0.3}$ pBRC1::*GUS*. Además, realizamos deleciones internas de esta región, las fusionamos a *GUS* (Fig. 33) y generamos las líneas  $\Delta^{0.5-0.4}$ pBRC1::*GUS* y  $\Delta^{0.4-0.3}$ pBRC1::*GUS* (Fig. 33). Las líneas T3 para estas deleciones internas se están desarrollando actualmente. También estudiamos el patrón de expresión de *GUS* en líneas T3 de las construcciones  $\Delta^{0.66-0.4}$ pBRC1::*GUS*,  $\Delta^{0.6-0.4}$ pBRC1::*GUS* y  $\Delta^{0.6-0.5}$ pBRC1::*GUS*, y en estas no observamos tinción *GUS* (no mostrado).

### 2.3. Análisis de la región entre -504 pb y -337 pb en 5' de BRC1

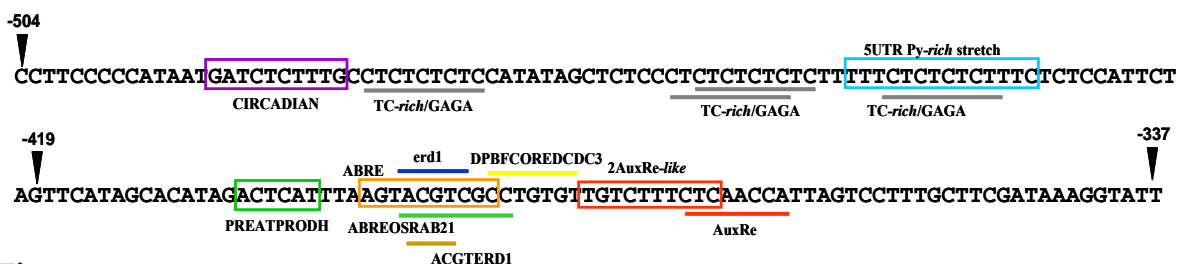
Para analizar más en detalle esta región estudiamos la presencia de sitios de unión a factores de transcripción conocidos, utilizando las bases de datos disponibles. Los sitios más relevantes encontrados son un motivo que regula el ritmo circadiano, varias regiones ricas en dinucleótidos TC, sitios de unión para factores bZIP y elementos de respuesta a auxinas (Fig. 36 y Tabla 6).

El motivo CIRCADIAN (CAANNNNATC, -490 pb) está presente en genes cuya transcripción está regulada de forma circadiana (Piechulla *et al.*, 1998).

Los sitios TC-rich/GAGA (-475 pb, -453 pb, -451 pb y -436 pb) y 5UTR Py-rich (-450 pb) están descritos como intensificadores de la transcripción (Sangran y O'Brian, 2002; Pauli *et al.*, 2004). En plantas, a estos sitios se unen al menos los factores de la familia BBR/BPC (Santi *et al.*, 2003).

Entre -419 y -337 pb hay un grupo de sitios de unión para factores de la familia bZIP: ACGTERD1, erd1, ABREOSRAB21 y ABRE que comparten la secuencia ACGT, única en los 1762 pb de la región en 5' de *BRC1* analizada. DPBFCOREDCDC3 y PREATPRODHD también son sitios de unión a factores bZIP (Jakoby *et al.*, 2002; Weltmeier *et al.*, 2006). En conjunto estos sitios actúan en respuesta a estrés hídrico, térmico o salino mediado por ácido abscísico (Kang *et al.*, 2002).

A continuación se encuentra la secuencia TGTCTTTCTC (Fig. 36, elemento 2AuxRe-like, -378 pb) que contiene dos elementos de respuesta a auxinas no canónicos solapados: TGTCTT y TTTCTC, frente al elemento simple canónico TGTCTC (Ulmasov *et al.*, 1997) (en negrita se indican las bases que cambian). En TGTCTC el primer dinucleótido TC (subrayado) es crítico para su correcta función (Liu *et al.*, 1994). A los elementos TGTCTC se unen al menos los factores ARF (Hagen y Guilfoyle, 2002). Además, este elemento 2AuxRe-like solapa en parte con la secuencia CTCAACCA (Fig. 36, elemento AuxRe, -371 pb), que está descrita como parte de un elemento de respuesta a auxinas (Ballas *et al.*, 1993).



**Figura 36.** Secuencia entre -504 pb y -337 pb del promotor de *BRC1* con motivos de unión a factores de transcripción. Las puntas de flecha verticales indican la posición respecto del ATG de *BRC1*. Las cajas y líneas en color marcan los diferentes sitios de unión descritos en el texto.

**Tabla 6.** Motivos de unión a factores de transcripción localizados en el fragmento de -504 a -337 del promotor de *BRC1* según las bases de datos.

Motivo <sup>a</sup>	Secuencia <sup>b</sup>	Descripción	Base de datos
CIRCADIAN	CAANNNNATC	Región necesaria para la expresión circadiana	PLACE/PLANT CARE
TC-rich/GAGA/ 5'UTR <i>Py-rich stretch</i>	TCTCTCTCT	Puede actuar como intensificador de la expresión génica	PLACE/SOFTBERRY/PLANT CARE
DPBFCOREDCDC3	ACACNNG	Sitio de unión a factores bZIP tipo DPBF	PLACE
PREATPRODH	ACTCAT	Sitio de unión de bZIP para respuesta a hipoosmolaridad	PLACE
ACGTERD1	ACGT	Elementos de respuesta a ácido abscísico y sitios de unión de factores bZIP	PLACE
Erd1	TACGTC		SOFTBERRY
ABREOSRAB21	ACGTSSSC		PLACE
ABRE	AGTACGTGGC		PLANT CARE
AuxRe	CTCAACCA	Forma parte de un AuxRe	PATCH [TRANSFAC]
AuxRe-like	TGTCTC	Elemento canónico de respuesta a auxinas	SOFTBERRY

<sup>a</sup> Se mantiene el nombre original del motivo dado en cada programa.

<sup>b</sup> N= cualquier base; S= C o G; en negrita y cursiva se indica el sitio ACGT ultraconservado compartido por ese conjunto de elementos; subrayado se indica la base que es distinta en el promotor de *BRC1*.

## 2.4. Búsqueda de secuencias conservadas de la región entre -504 pb y -337 pb en 5' de *BRC1*

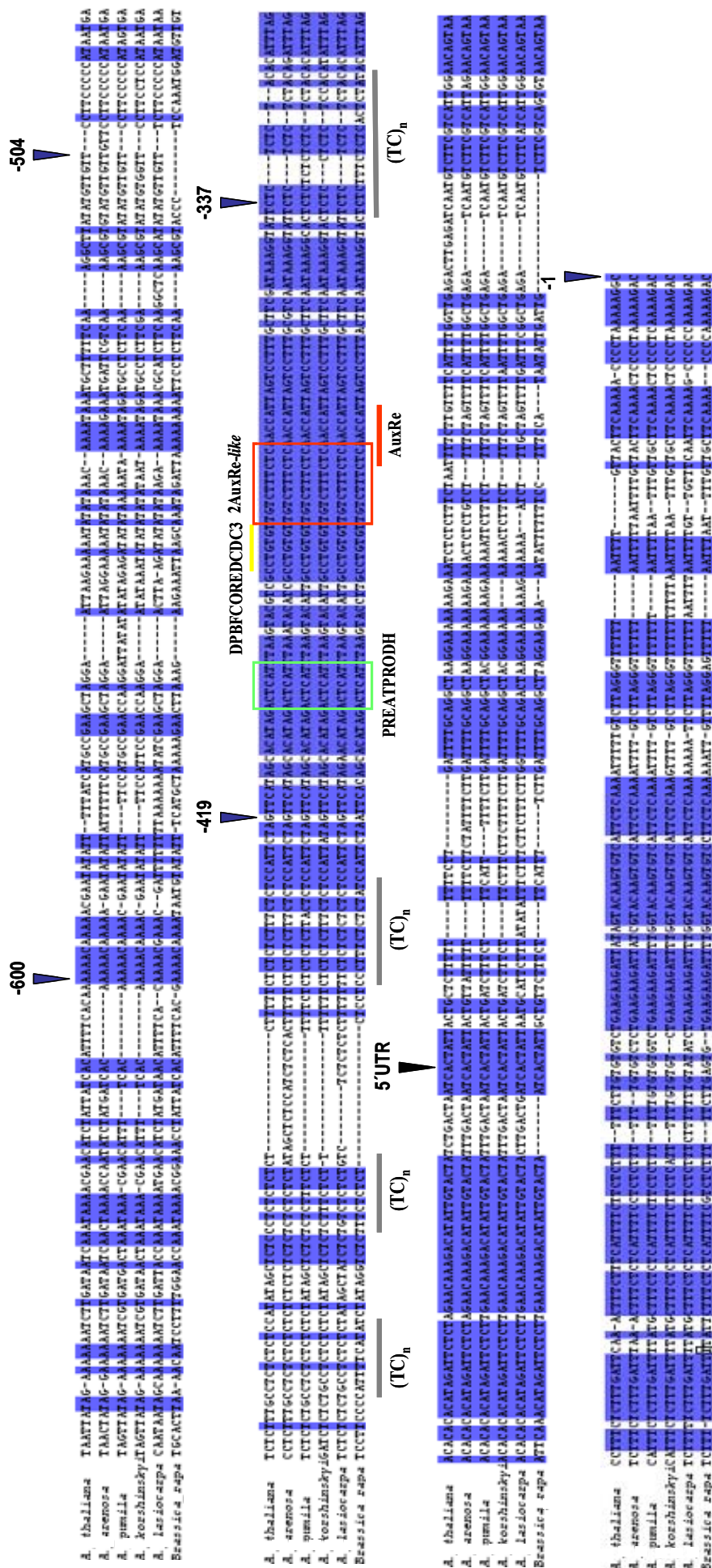
Para evaluar la importancia de estos motivos estudiamos el grado de conservación de esta región en especies filogenéticamente próximas a *Arabidopsis*. Para ello aislamos esta región mediante PCR sobre DNA genómico de las especies de Brasicáceas *Arabidopsis lasiocarpa*, *A. arenosa*, *A. pumila*, *A. korshinskyi* y *Brassica rapa* y comparamos sus secuencias después de alinearlas con ClustalW (Fig. 37). Observamos que el sitio para ritmo circadiano no aparece en las otras especies. Además la expresión de *BRC1* no tiene oscilaciones circadianas (no mostrado). En la zona con sitios de unión a factores bZIP, no se conserva la secuencia ACGT canónica pero sí los sitios PREATPRODH y DPBFCOREDCDC3. Por otro lado los elementos ricos en TCs están bastante conservados y también se conservan los putativos sitios de respuesta a auxinas.

Posteriormente extendimos el análisis anterior a especies más alejadas filogenéticamente de *Arabidopsis* y estudiamos los promotores de los ortólogos de *BRC1* en las dicotiledóneas chopo (*Populus trichocarpa*), tomate (*Solanum lycopersicum*), ricino (*Ricinus communis*), vid (*Vitis vinifera*), y en las monocotiledóneas arroz (*Oryza sativa* cvs. *japonica* e *indica*), sorgo (*Sorghum bicolor*), mijo perla (*Pennisetum glaucum*) y maíz (*Zea mays*). .

Mientras que en monocotiledóneas solamente hay un gen de este tipo, *Tb1*, en dicotiledóneas hay 3 genes muy relacionados, *BRC1*, *BRC2* y *CYC* (ver Introducción). Para identificar el ortólogo a *BRC1* en dicotiledóneas realizamos un análisis filogenético de los genes identificados utilizando su caja TCP.

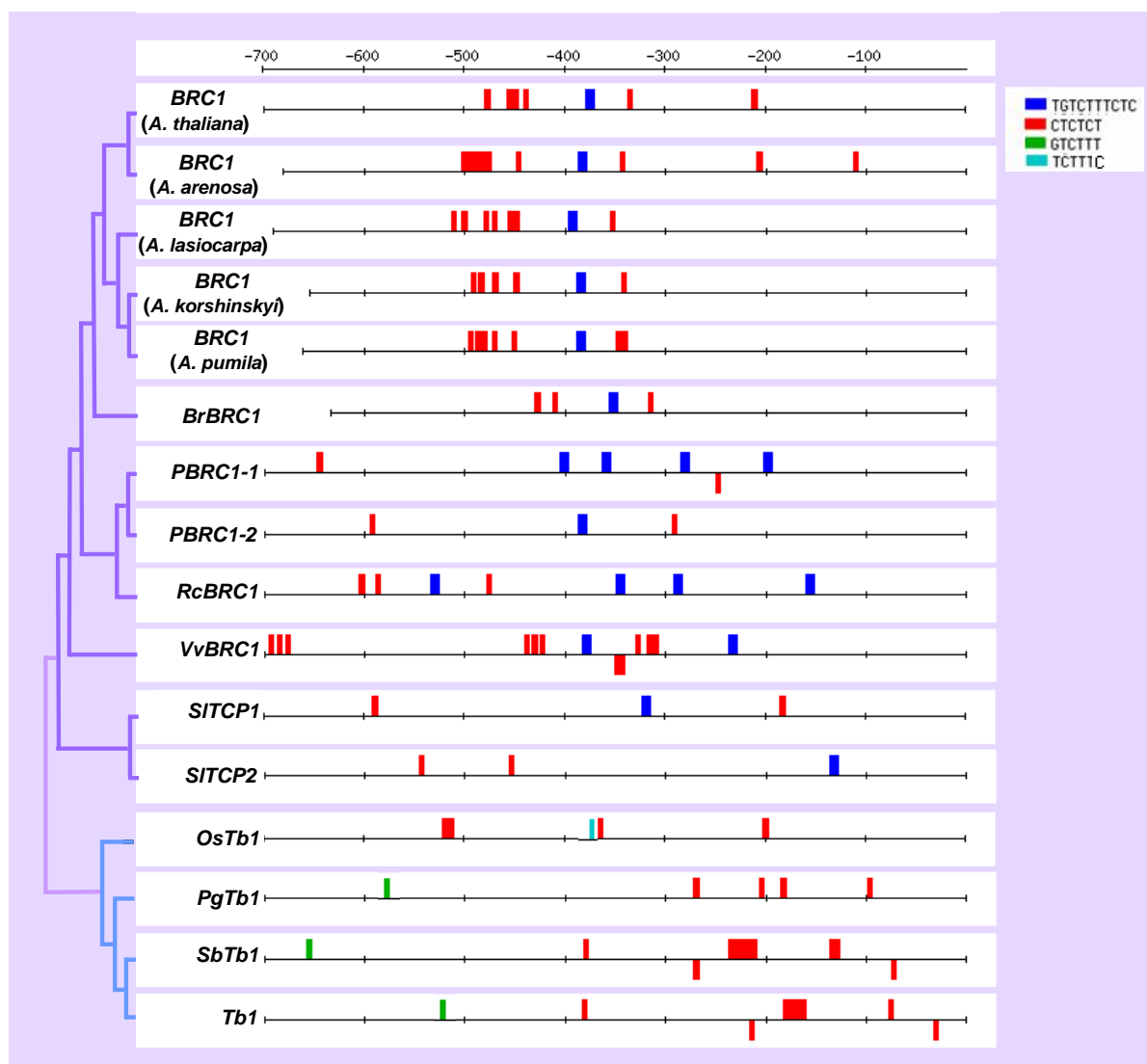
En chopo cuyo genoma está disponible (<http://www.ornl.gov/sci/ipgc/>) determinamos que hay dos homólogos a *BRC1* que denominamos *PBRC1-1* y *PBRC1-2* e identificamos sus regiones genómicas flanqueantes.





**Figura 37.** Alineamiento de secuencias en 5' de BRC1 en *Arabidopsis thaliana*, *A. pumila*, *A. arenosa*, *A. korshinskii* y *Brassica rapa*. Las cabezas de flecha marcan posición respecto al ATG. En azul se representan las secuencias completamente conservadas. Las líneas grises indican zonas ricas en TCs. La distinta longitud de los motivos (TC)<sub>n</sub> no permite alinearlos adecuadamente. La caja verde indica el sitio PREATPRODH, la línea amarilla el elemento DPBFCOREDCDC3, la caja y la línea roja, los elementos de respuesta a auxinas. El alineamiento de las secuencias se hizo con ClustalW.

En tomate, a partir de la zona codificante de los ortólogos de *BRC1*, *SITCP1* y *SITCP2* (aislados en nuestro laboratorio), obtuvimos regiones 5' no codificantes utilizando una librería de *Genome Walking* (cedida por J.M. Daviére).



**Figura 38.** Alineamiento de secuencias en 5' de genes ortólogos a *BRC1*. La escala en la parte superior indica pb respecto del ATG. Se muestran los genes *BRC1* de varias especies de *Arabidopsis*, en *Brassica rapa* (*BrBRC1*), chopo (*PBRC11* y *PBRC12*), ricino (*RcBRC1*), vid (*VvBRC1*), tomate (*SITCP1* y *SITCP2*), arroz (*OsTb1*), mijo perla (*PgTb1*), sorgo (*SbTb1*) y maíz (*Tb1*). En azul oscuro están representados los motivos de respuesta a auxinas no canónicos TGTCTTTCTC, en verde su variante GTCTTT y en azul claro la variante TCTTTC; en rojo las repeticiones TCTCTC. A la izquierda se indican las relaciones entre especies según <http://www.mobot.org/> a nivel de orden, familia o tribu: *Populus* de Salicáceas, *Ricinus* de Euforbiáceas y ambas de Malpighiales; *Arabidopsis* y *Brassica* de Brassicales; *Vitis* de Vitales; *Solanum* de Solanales; dentro de Poáceas, *Oryza* en Orizoideas, y *Pennisetum*, *Sorghum* y *Zea* de Panicoideas. Dentro de las Brasicáceas las relaciones entre especies se establecieron según O'Kane y Al-Shehbaz (2003).



Esta secuencia está representada 2 veces en la secuencia de *VvBRC1* de vid y 4 veces en *PBRC1-1* de chopo y en *RcBRC1* de ricino. La probabilidad de que este motivo aparezca al azar en una región de 700 pb es de  $6.7 \cdot 10^{-4}$ . Por otra parte en las especies analizadas ninguno de los promotores de los genes de la misma subfamilia, *BRC2* y *CYC*, tienen este motivo representado (no mostrado). En monocotiledóneas este motivo no está presente de forma completa: en arroz sólo parece estar conservada la secuencia TCTTTCT en los cultivares *japonica* (Fig. 38) e *indica* (no mostrado). En maíz, sorgo y mijo perla está únicamente la secuencia GTCTTT.

Por otro lado las repeticiones de TCs están presentes en todas las especies, con mayor representación en maíz (*Tb1*), sorgo (*SbTb1*) y arroz (*OsTb1*) (Fig. 38). Los otros motivos conservados en especies cercanas a *Arabidopsis* (PREATPROD, DPBFCOREDCDC3 y AuxRE, Fig. 37) no lo están en especies más alejadas.

Por tanto hay dos tipos de motivos conservados al menos en dicotiledóneas: repeticiones (TC)<sub>n</sub> y la secuencia TGTCTTTCTC. En *Arabidopsis* la mayor parte de TCs está entre -504 y -419 pb (Fig. 37). En líneas con la construcción  $\Delta^{0.4}pBRC1::GUS$ , sin estas repeticiones, detectamos expresión en yemas caulinares pero no en las de roseta (Fig. 34), por lo que estas repeticiones pueden actuar como intensificadores de la expresión de *BRC1*. Por otra parte en líneas con la construcción  $\Delta^{0.4}pBRC1::GUS$ , sin el motivo TGTCTTTCTC, no detectamos expresión de *GUS* (Fig. 34), por lo que esta secuencia conservada parece ser importante para la correcta expresión axilar de *BRC1*.

### 2.5. Respuesta del promotor de *BRC1* en Solanáceas

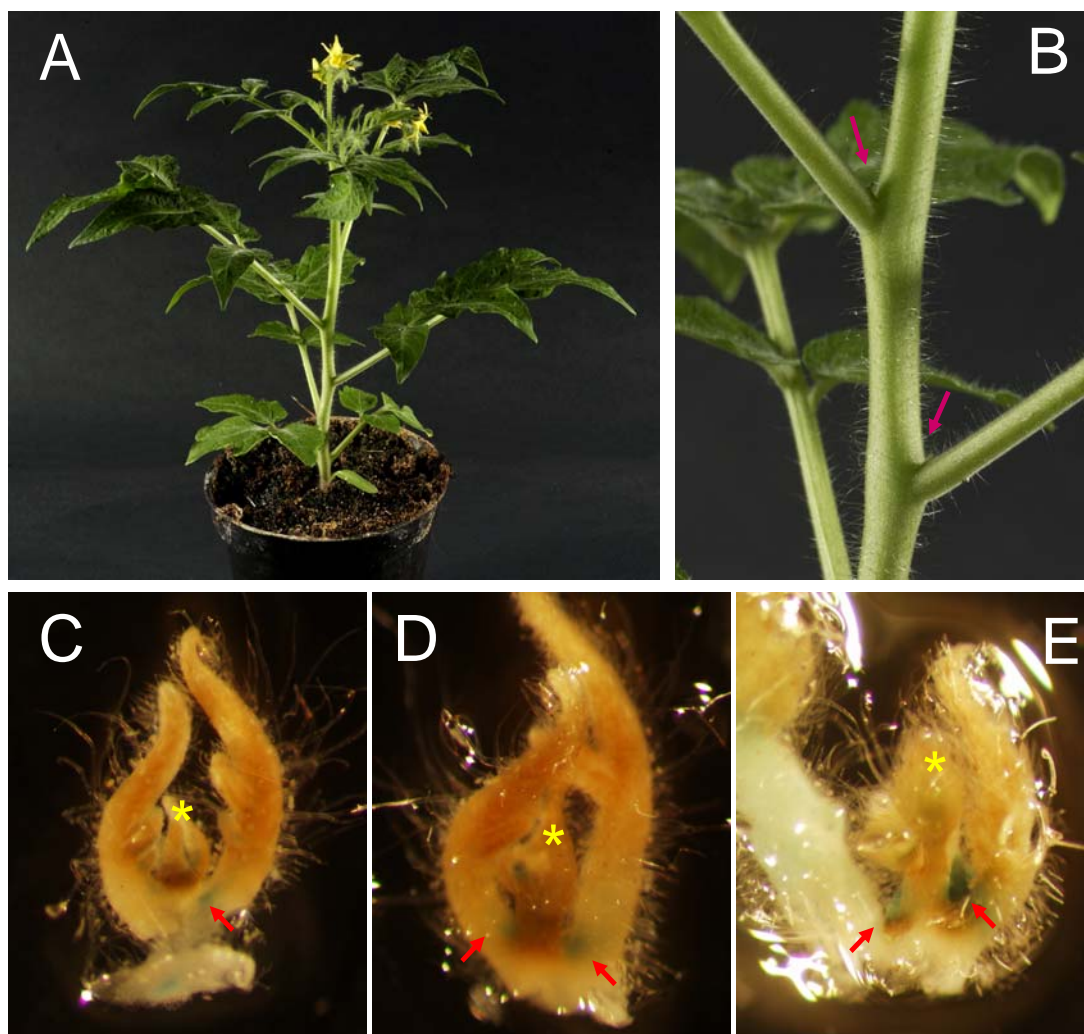
Otra aproximación que hemos llevado a cabo para estudiar el grado de conservación de la regulación de *BRC1* ha sido introducir la construcción  $\Delta^{1.7}pBRC1::GUS$  en especies transformables y filogenéticamente alejadas de *A. thaliana* para estudiar si este fragmento responde correctamente en estas especies.

En concreto elegimos las especies de la familia de las Solanáceas patata (*Solanum tuberosum*) y tomate (*Solanum lycopersicum*), divergentes de *Arabidopsis* hace unos 112 m.a. (Ku *et al.*, 2000). Generamos líneas transgénicas de patata y tomate con la construcción  $\Delta^{1.7}pBRC1::GUS$  y estudiamos su patrón de expresión de *GUS*.

En tomate, durante la fase vegetativa, el patrón de ramificación es monopódico. Después de la transición floral el patrón de ramificación es simpódico: el meristemo apical se transforma en una inflorescencia y el crecimiento de la planta se produce por elongación del meristemo axilar de la hoja más cercana al ápice (Schmitz y Theres, 1999).

En total obtuvimos 35 líneas transgénicas de tomate de las cuales 6 mostraban tinción *GUS* y produjeron semillas. En estas plantas la expresión del gen *GUS* se detectó desde los primeros momentos del desarrollo de las yemas axilares. Durante el desarrollo de las inflorescencias la expresión *GUS* se detectó en las zonas axilares de las hojas que iban a dar lugar a una nueva yema axilar (Figs. 39C-E).

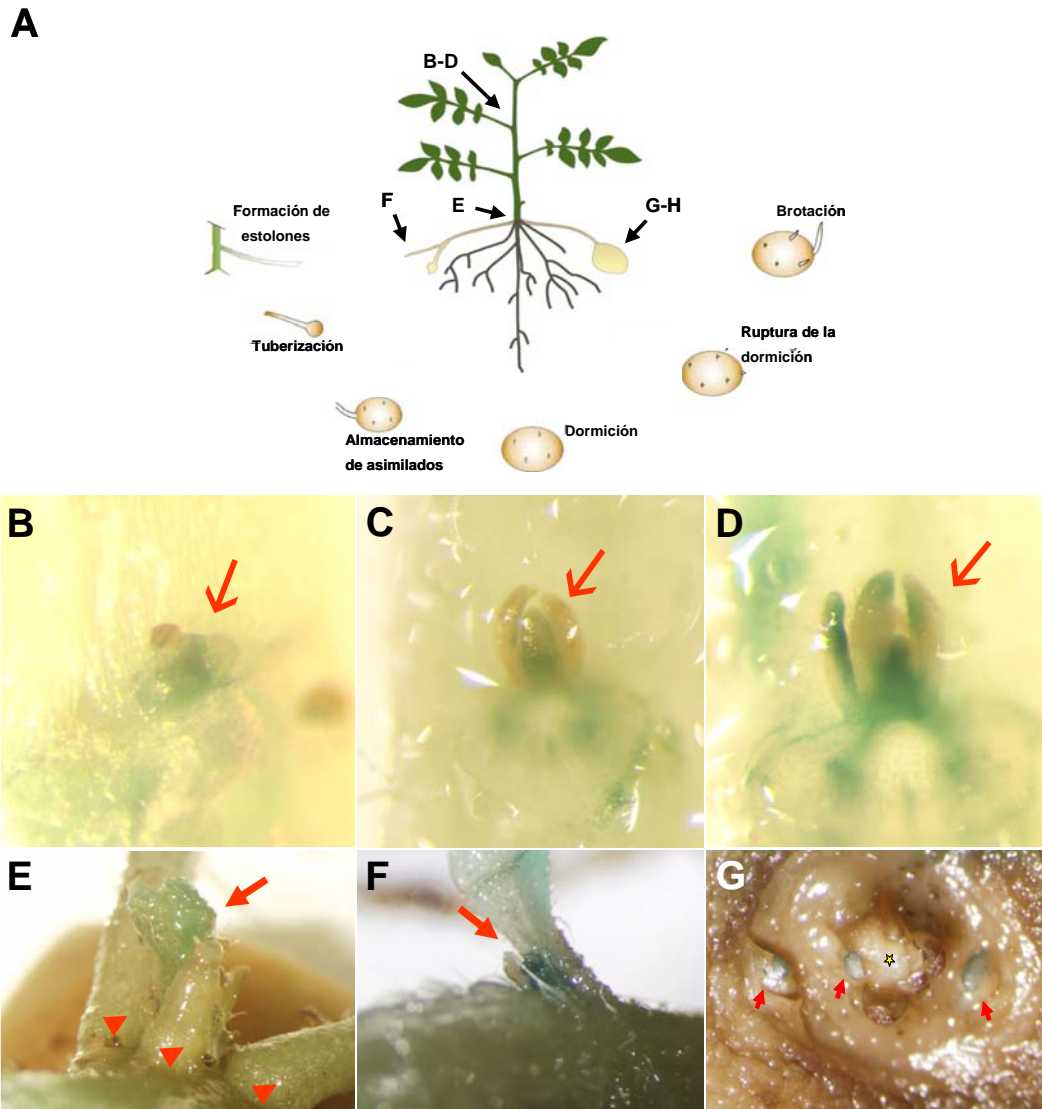
En patata, el patrón de desarrollo axilar de la parte aérea es similar al de tomate (Ewing y Struik, 1992) pero además durante el desarrollo de la planta se forman otros tipos de yemas axilares (Fig. 40A): de la base del tallo nacen brotes laterales (estolones) que en condiciones adecuadas engrosan por el extremo, formando tubérculos, que acumulan almidón. A su vez los “ojos” de estos tubérculos también son yemas axilares que, una vez brotadas, pueden originar nuevas plantas (Ewing y Struik 1992).



**Figura 39.** Expresión GUS en yemas axilares de plantas de tomate portadoras de la construcción  $\Delta^{17}pBRC1::GUS$  de *Arabidopsis*. **A)** Vista general del cultivar 'Microtom' de tomate utilizado. **B)** Primer plano de la planta en **A)** en la que indicamos con flechas la posición de las yemas. **C,E)** Yemas axilares de tomate aisladas en las que se detecta señal de actividad GUS en posiciones axilares (flechas). Los asteriscos indican la zona apical de las yemas.

Obtuvimos un total de 46 líneas de plantas transgénicas, de las cuales 20 mostraban expresión GUS tanto en las yemas axilares aéreas que dan lugar a ramas (Figs. 40B-D), como en los estolones (Figs. 40E, F) y también en los "ojos" de los tubérculos (Fig. 40G).

Estos resultados indican que el promotor de *BRC1* responde correctamente en tomate y patata. Anteriormente hemos mostrado que los únicos motivos conservados entre el promotor de *BRC1* y los de *SITCP1* y *SITCP2* son la zona rica en TC y el motivo de 10 pb TGTCTTTCTC (Fig. 38), lo que parece apoyar la idea de que estos motivos son importantes para la expresión axilar de este gen.



**Figura 40.** Expresión GUS en yemas axilares de plantas de patata portadoras de la construcción  $\Delta^{1.7}\text{pBRC1}::\text{GUS}$  de Arabidopsis. **A)** Ciclo de desarrollo en patata. **B-D)** Expresión de GUS en yemas axilares aéreas en distintos estadios de desarrollo. **E)** Detalle de la región basal del tallo. El estolón emergente (flecha) presenta expresión GUS, pero no las raíces adventicias (cabezas de flecha). **F)** Expresión GUS en una yema axilar de estolón (flecha). **G)** Tinción GUS de un tubérculo en el que sólo las yemas están teñidas (cabezas de flecha).

## 2.6. Búsqueda de elementos en *trans* que se unen al promotor de *BRC1*: ensayo de híbrido sencillo

En paralelo al análisis filogenómico hemos realizado un escrutinio híbrido sencillo para identificar factores que se unen a esta región. Probamos dos fragmentos del promotor de *BRC1*, de -704 a -419 pb (285 pb) que contiene las regiones ricas en TC y de -419 a -337 pb (82 pb) que contiene el motivo de 10 pb. Clonamos respectivamente estos fragmentos en el plásmido pHisi y los integramos en la cepa de levadura Y187. Utilizamos una librería normalizada de cDNAs expresados en toda la planta de Arabidopsis para confrontar con los fragmentos de promotor de *BRC1*. En el escrutinio con el fragmento de -704 a -419 pb obtuvimos 19 clones positivos entre los cuales hay genes con un posible papel en la regulación transcripcional: *AtMYB21* (At3g27810) y *VRN2* (*VERNALIZATION2*, At4g16845). *AtMYB21* se expresa en flores y el mutante de falta de función *myb21-1* afecta al desarrollo normal de las flores (Mandaokar *et al.*, 2006). *VRN2* codifica para una

proteína del grupo *Polycomb* (PcG) necesaria para la represión epigenética del represor de la floración *FLC* (Gendall *et al.*, 2001).

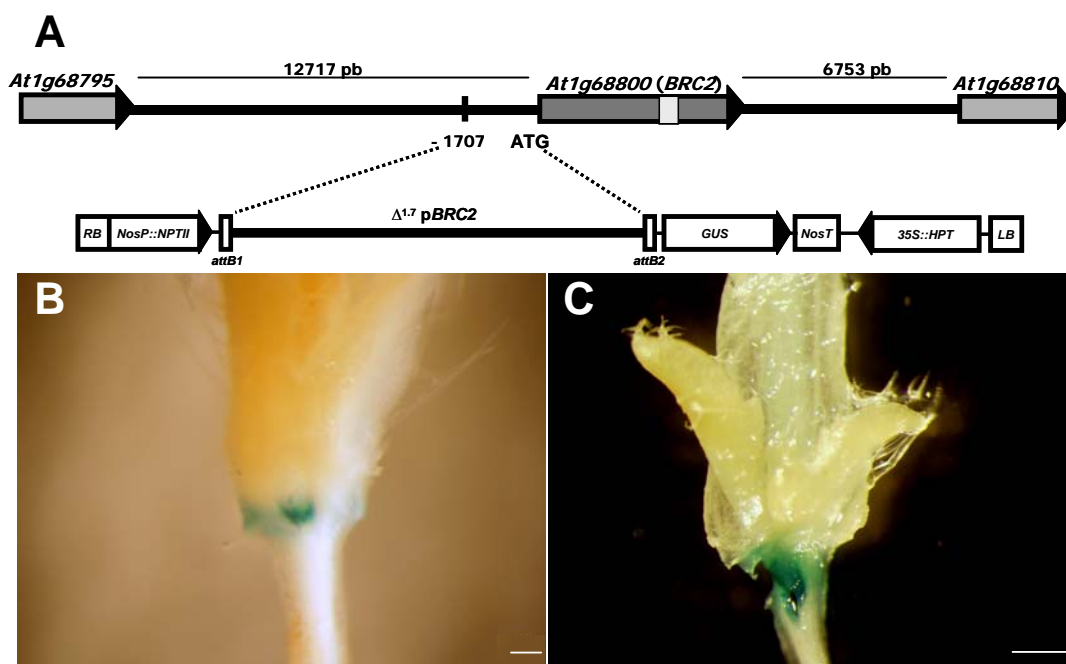
En el escrutinio con el fragmento entre -419 pb y -337 pb aislamos 8 clones entre los cuales hay un miembro de la familia *DDT* (At5g22760), formada por 4 genes no caracterizados funcionalmente. Además del dominio DDT de posible unión a DNA (Doerks *et al.*, 2001) este gen tiene 4 dominios PHD de interacción con proteínas y que suelen encontrarse en factores que actúan remodelando cromatina (Bienz, 2006). Actualmente estamos confirmando la posible interacción de estos factores con los fragmentos del promotor estudiados.

De los resultados presentados en esta parte podemos concluir que en 1.7 Kb en 5' del ATG de *BRC1* están las secuencias necesarias para la expresión en yemas axilares de *BRC1* y para su respuesta a auxinas. Mediante análisis de delección hemos acotado estas regiones al fragmento entre -504 y -337 pb en la que hay conservadas repeticiones de TCs que posiblemente actúen como intensificadores de la expresión génica, y el motivo TGTCTTTCTC que podría ser responsable de la expresión en yemas axilares y de la respuesta a auxina. También hemos mostrado que existe una posible regulación post-transcripcional de *BRC1* mediada por la ruta MAX y por calidad e intensidad de luz.

### 3. Análisis del promotor de *BRC2*

#### 3.1. Patrón de expresión de la construcción $\Delta^{1.7}$ p*BRC2*::*GUS*

Aislamos 1707 pb de la región en 5' de *BRC2* y la fusionamos a *GUS*, generando la construcción  $\Delta^{1.7}$ p*BRC2*::*GUS* (Fig. 41A). Analizamos el patrón de expresión de *GUS* en líneas T3 de esta construcción y determinamos que hay expresión en la base de las yemas axilares y no en otras partes de la planta (Figs. 41B, C).



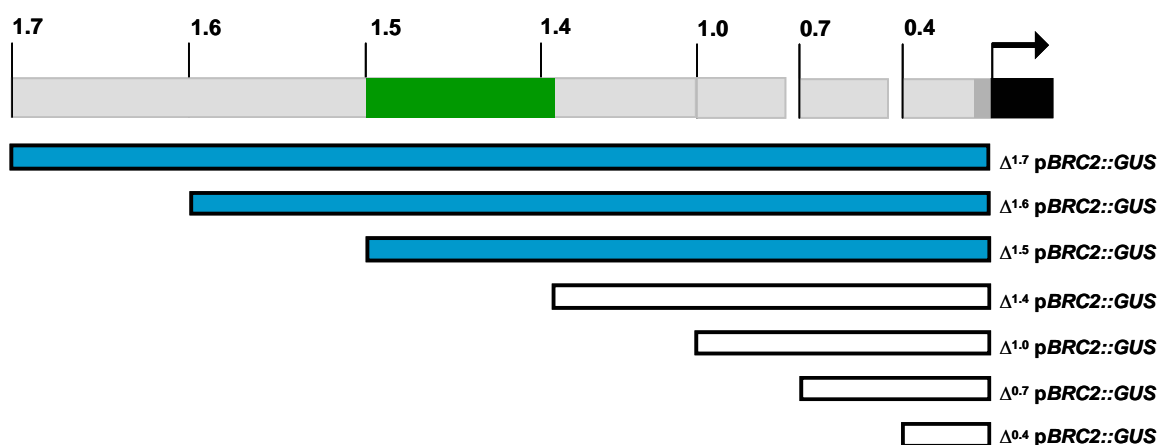
**Figura 41.** Análisis del promotor de *BRC2*. A) Esquema de la construcción inicial  $\Delta^{1.7}$  p*BRC2*::*GUS*. B) Planta de una línea T3  $\Delta^{1.7}$ p*BRC2*::*GUS* de la que se han eliminado las yemas axilares y las hojas de la roseta. La expresión de *GUS* se detecta en la base de las yemas. C) Yema axilar en una hoja de roseta de una planta como en B. La proteína *GUS* se detecta en la base de las yemas axilares. Barra de escala = 500  $\mu$ m.

### 3.2. Análisis de delección del promotor de *BRC2*

A partir de la construcción inicial  $\Delta^{1.7}\text{pBRC2}::\text{GUS}$  generamos nuevas construcciones utilizando fragmentos cada vez menores:  $\Delta^{1.4}\text{pBRC2}::\text{GUS}$ ,  $\Delta^{1.0}\text{pBRC2}::\text{GUS}$ ,  $\Delta^{0.7}\text{pBRC2}::\text{GUS}$  y  $\Delta^{0.4}\text{pBRC2}::\text{GUS}$  (Fig. 42, Tabla 7). Al analizar el patrón de expresión de GUS en líneas T3 de estas construcciones no observamos expresión en ninguna de ellas (no mostrado). Esto sugiere que entre -1707pb y -1388pb se encuentran las regiones necesarias para la expresión de *BRC2*. Para acotar más estas regiones generamos las construcciones  $\Delta^{1.6}\text{pBRC2}::\text{GUS}$  y  $\Delta^{1.5}\text{pBRC2}::\text{GUS}$  (Fig. 42, Tabla 7). En este caso observamos expresión de GUS en plantas de líneas T3 de ambas construcciones (Fig. 43), indicando que entre 1500 y -1388 pb estarían las secuencias necesarias para la expresión de *BRC2*.

### 3.3. Análisis de la secuencia entre -1500 y -1388 pb del ATG de *BRC2*

Hemos estudiado los posibles sitios de unión de factores de transcripción del fragmento entre -1500 y -1388 pb (112pb) que hemos determinado en el apartado anterior por análisis de delección (Fig. 44, Tabla 8). En esta región se encuentran varios sitios necesarios para la inducción por citoquininas (elementos ARR1AT; Ross *et al.*, 2004 y CPBCSPOR; Naoki *et al.*, 2005). Hay además 2 GT1-boxes, implicadas principalmente en la regulación por luz (Zhou, 1999) y un sitio canónico TGTCTC de regulación por auxinas (Ulmasov *et al.*, 1997). Sin embargo en apartados anteriores hemos mostrado que *BRC2* no se induce por auxinas (Fig. 17), citoquininas (Fig. 19) o luz (Figs. 22 y 24), por lo que la relevancia de estos motivos no está clara.

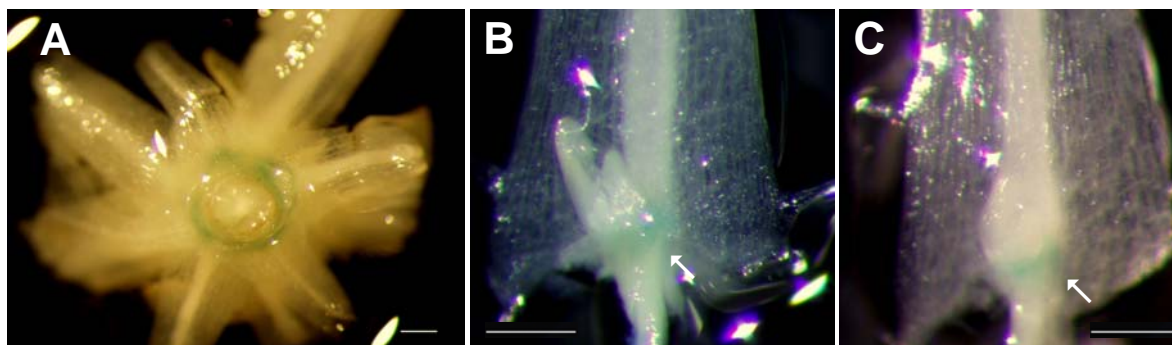


**Figura 42.** Esquema de las fusiones a *GUS* de los fragmentos del promotor de *BRC2* generadas. La barra superior representa la región en 5' de *BRC2* estudiada y está dividida no a escala en miles de pares de bases. Los números indican las distancias en pares de bases desde el ATG. En gris oscuro se representa la región 5'UTR (hasta 69 pb), en negro y con flecha, el inicio de la zona codificante. En verde oscuro se señala la zona importante para la regulación de *BRC2*. Las barras inferiores representan las distintas fusiones a *GUS*, que se indican junto a ellas por su nombre. En azul oscuro se indica que se detecta expresión GUS en esas líneas y en blanco que no hay tinción GUS en la base de las yemas axilares.

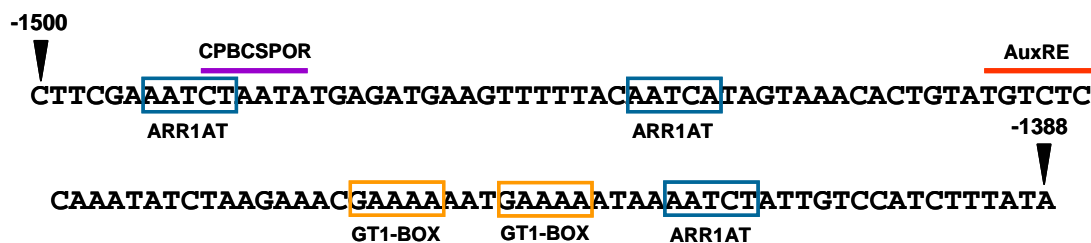


**Tabla 7.** Líneas T1 y T3 generadas de las construcciones con fusiones a *GUS* de fragmentos del promotor de *BRC2* indicadas en la Fig. 41.

Construcción	Nº Líneas T1	Nº Líneas T3
$\Delta^{1.7}$ p <i>BRC2</i> :: <i>GUS</i>	34	16
$\Delta^{1.6}$ p <i>BRC2</i> :: <i>GUS</i>	11	3
$\Delta^{1.5}$ p <i>BRC2</i> :: <i>GUS</i>	6	6
$\Delta^{1.4}$ p <i>BRC2</i> :: <i>GUS</i>	22	11
$\Delta^{1.0}$ p <i>BRC2</i> :: <i>GUS</i>	13	7
$\Delta^{0.7}$ p <i>BRC2</i> :: <i>GUS</i>	36	5
$\Delta^{0.4}$ p <i>BRC2</i> :: <i>GUS</i>	20	5



**Figura 43.** Tinciones *GUS* de yemas axilares de plantas de líneas T3 de las construcciones  $\Delta^{1.6}$ p*BRC2*::*GUS* (A, base de una roseta; B, yema axilar) y  $\Delta^{1.5}$ p*BRC2*::*GUS* (C). Barra de escala = 500  $\mu$ m.



**Figura 44.** Secuencia entre -1500 pb y -1388 pb del promotor de *BRC2* con indicación de los sitios de unión a factores de transcripción según las bases de datos analizadas. Las puntas de flecha verticales indican la posición respecto del ATG de *BRC2*. La dirección de las flechas indica complementariedad en la secuencia del sitio de unión.

**Tabla 8.** Secuencias reguladoras en *cis* en el fragmento de -1500 pb y -1388 pb del promotor de *BRC2* según los programas indicados.

Motivo <sup>a</sup>	Secuencia <sup>b</sup>	Descripción	Base de datos
ARR1AT	NGATT	Elemento de unión del factor ARR1 (en arroz)	PLACE
CPBCSPOR	TATTAG	Sitio necesario para la activación por citoquininas (en calabaza)	PLACE
AuxRE	TGTCTC	Elemento de respuesta a auxinas	SOFTBERRY /PLACE/PATCH [TRANSFAC]
GT1-box	GAAAA	Motivo relacionado principalmente con la regulación por luz	PLACE/PATCH [TRANSFAC]

<sup>a</sup> Se mantiene el nombre original del motivo dado en cada programa.

<sup>b</sup> N= cualquier base.

## Discusión

## 1. Función de *BRC1* en el control de la ramificación

Nuestra hipótesis de partida era que los genes de *Arabidopsis* relacionados con *Tb1*, *BRC1* y/o *BRC2* podían tener también una función como represores del desarrollo de las yemas axilares, ya que su patrón de expresión es similar al de *Tb1*.

En monocotiledóneas se ha identificado una única copia de genes *CYC/Tb1*, mientras que en dicotiledóneas hay tres: genes tipo *BRC1* (también denominados *CYC1*, Howarth y Donoghue, 2006), genes tipo *BRC2* (*CYC3*) y genes tipo *TCP1/CYC* (*CYC2*). Se ha propuesto que en las eudicotas basales dos duplicaciones sucesivas de un único gen ancestral dieron lugar a estos tres tipos de genes (Howarth y Donoghue, 2006). Después de estas duplicaciones, la función del gen ancestral podría haberse conservado de forma heterogénea en los distintos clados (Force et al., 1999; Taylor y Raes, 2004). Esto implica que no existe un ortólogo directo de *Tb1*, que controla el crecimiento de yemas axilares y meristemos reproductivos, sino tres genes que han mantenido de forma desigual las funciones de *Tb1*.

Mediante el análisis de mutantes (Figs. 10 y 11) hemos encontrado que *BRC1*, más que *BRC2*, parece haber conservado la función de *Tb1* como represor del crecimiento de las yemas axilares, ya que sus mutantes son más ramificados que las plantas silvestres. *BRC1* es el primer gen descrito en *Arabidopsis* que controla el proceso del desarrollo de yemas localmente, actuando directamente en las yemas axilares. Otros mutantes, como los *max*, también son más ramificados que las plantas silvestres, pero sus fenotipos son más pleiotrópicos y además se ha demostrado que sus genes correspondientes actúan fuera de la yema (McSteen y Leyser, 2005).

Las mutaciones en *BRC2* por el contrario no producen plantas más ramificadas que las silvestres en día largo aunque sí en día corto (Fig. 12). Este tipo de comportamiento también se observa en otros mutantes, como *las* (Greb et al., 2003), *rax* (Muller et al., 2006) o *era1* (Bonetta et al., 2000), que muestran un fenotipo de menor ramificación en día corto mientras que en día largo son prácticamente indistinguibles de las plantas silvestres. El diferente comportamiento de *BRC2* y otros genes dependiente del fotoperíodo puede indicar que el desarrollo de las yemas axilares se controla a través de distintas rutas genéticas en día corto y en día largo.

*BRC1* se expresa en yemas axilares y actúa inhibiendo localmente su desarrollo (Fig. 11). Además hemos mostrado que la expresión generalizada de *BRC1* no provoca la inhibición de las yemas axilares sino un retraso generalizado en el crecimiento de las plantas (Fig. 8) y que la sobreexpresión de fusiones de *BRC1* con el activador transcripcional VP16, producen letalidad embrionaria (Fig. 8). Esto parece indicar que *BRC1* tiene una función represora del crecimiento similar a la de otros genes *TCP* de la clase II, como *CYC* de *Antirrhinum*, que retrasa el desarrollo de la parte dorsal de los meristemos florales (Luo et al., 1996) o *TCP4* de *Arabidopsis* y su homólogo *CIN* en *Antirrhinum*, que controlan negativamente los patrones de proliferación durante el desarrollo de las hojas (Palatnik et al., 2003; Nath et al., 2003).

Hemos mostrado que las proteínas *BRC1* y *BRC2* se localizan en el núcleo (Fig. 7), lo que apoya su posible actuación como factores de transcripción. La localización nuclear de otras proteínas *TCP* clase II ya se había descrito previamente por bombardeo de células epidérmicas de cebolla o de tabaco. Por ejemplo se ha demostrado la localización nuclear



de LjCYC1, homólogo de CYC/TCP1 en *Lotus japonicus* (Qin *et al.*, 2004) y la de TCP13 de *Arabidopsis* (Suzuki *et al.*, 2001), aunque esta proteína también se localiza en cloroplastos (Baba *et al.*, 2001, que la denominan PTF1).

BRC1, una proteína TCP de la clase II, ejerce su acción en el núcleo celular y su función causa un arresto del crecimiento. Esta proteína podría actuar, por ejemplo, reprimiendo genes promotores del control del ciclo celular. Cabe destacar que los genes TCP de la clase I están implicados en el proceso contrario: la activación de genes necesarios para la división celular y el crecimiento, como el PCNA, CYCB1;1 o genes para proteínas ribosomales (Kosugi y Ohashi, 2002; Tremousaygue *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005; Welchen y Gonzalez, 2006). Puesto que los factores de las clase I y II reconocen motivos de ADN solapantes, ambos tipos de proteínas podrían competir por los mismos promotores de forma que en presencia de BRC1 la transcripción de estos genes se vería afectada negativamente. Alternativamente, BRC1 podría formar heterodímeros a través del dominio TCP con proteínas de la clase I, inactivándolas (Cubas, 2002; Kosugi y Ohashi, 2002; Li *et al.*, 2005).

### 2. Interacción de BRC1 con genes de iniciación de meristemos axilares

Para determinar las interacciones genéticas entre BRC1 y otros genes necesarios para la formación de meristemos axilares hemos generado dobles mutantes entre *brc1* y los mutantes *las* e *ifl1* y hemos estudiado los niveles de ARNm de BRC1 en estos últimos (Fig. 14). *las* e *ifl1* son epistáticos sobre *brc1* (Figs. 14A, B): en los dobles mutantes no se forman más meristemos axilares que en los mutantes *las* e *ifl1* sugiriendo que LAS y también IFL1 son necesarios durante la iniciación de meristemos antes que BRC1. Por otro lado los niveles de transcripción de BRC1 y BRC2 en ambos mutantes están reducidos (Figs. 14C, D) como se esperaría si se forman menos yemas que en plantas silvestres (Greb *et al.*, 2003; Otsuga *et al.*, 2001). Estos datos indicarían que BRC1 actúa después de LAS e IFL1. En arroz, *OsTb1*, homólogo de BRC1, también actúa por debajo de MOC1, homólogo de LAS, ya que mediante análisis de expresión *in situ* no se observa expresión de *OsTb1* en mutantes *moc1* (Li *et al.*, 2003). Esta observación también es esperable ya que en este mutante no se forman meristemos axilares, lugar donde se expresa *OsTb1*. Sin embargo no es probable que LAS controle directamente la transcripción de BRC1 ya que nuestras líneas *las*;  $\Delta^{1.7}$ pBRC1::GUS tienen niveles normales de expresión GUS en las escasas yemas axilares que se forman (Figs. 31 y 32). Además los patrones de expresión espacial de LAS y de BRC1 durante el desarrollo de los meristemos axilares son complementarios: nunca hay expresión de BRC1 en una región donde se expresa LAS.

Por otra parte se ha descrito que IFL1 actúa por debajo de LAS en la formación de meristemos axilares, ya que LAS se expresa correctamente en mutantes *ifl1* pero IFL1 no se expresa en las axilas de las hojas de mutantes *las* (Greb *et al.*, 2003). Esto parece situar a IFL entre LAS y BRC1. IFL es un factor HD-Zip III, y recientemente se ha descrito que estos activan la expresión de los genes de la nueva familia LITTLE ZIPPER (ZPR) y además interaccionan con las proteínas ZPR (Wenkel *et al.*, 2007). Está por determinar la posible relación entre estas nuevas proteínas y BRC1.

Recientemente se han caracterizado otros genes que intervienen en la formación de los meristemos axilares, como los RAX (Muller *et al.*, 2006; Keller *et al.*, 2006), o se ha asignado un papel en este proceso a genes ya caracterizados, como los CUC (Hibara *et al.*,

2006). Sería interesante determinar la relación genética de *BRC1* con estos genes aunque es posible que también actúen, como *LAS* e *IFL1*, antes que *BRC1*. Existen algunos datos que indican posibles relaciones genéticas entre genes *TCP* y los genes *CUC*. Se ha encontrado (en ensayos de doble híbrido) que un factor *TCP* de clase I interacciona con *CUPULIFORMIS* (*CUP*), el homólogo en *Antirrhinum* de *CUC2* (Weir *et al.*, 2004). En *Arabidopsis* se ha demostrado recientemente que *TCP3* y otros genes del grupo CIN reprimen la expresión de genes de demarcación como *LAS*, *CUC* y *LOB* y que esta represión es necesaria para el correcto desarrollo de los órganos laterales (Koyama *et al.*, 2007). Hasta el momento desconocemos la posible relación entre los genes *CUC* y *BRC1*. Respecto a los genes *LATERAL ORGAN BOUNDARIES* (*LOB*), se expresan de forma similar a *LAS* o los *CUC*, en la base de los órganos laterales. Sin embargo a estos genes no se les ha asignado hasta ahora un papel en la iniciación de meristemos axilares (Shuai *et al.*, 2002).

### 3. Relación de *BRC1* con la señalización hormonal

#### 3.1. Auxinas

Aunque la dominancia apical en *Arabidopsis* no es muy pronunciada puesto que siempre se producen ramas caulinares CI (Fig. 11; Cline, 1991), la decapitación permite la formación de un mayor número de ramas de roseta RI (Fig. 16; Tatematsu *et al.*, 2005). Sin embargo esta respuesta no se observa al decapitar mutantes *brc1* (Fig. 16). Además, cuando decapitamos plantas silvestres, los niveles de ARNm de *BRC1* se reducen rápidamente lo que se correlaciona con la activación de yemas. Esto parece indicar que *BRC1* podría mediar la respuesta de dominancia apical. Por otro lado, *BRC1* responde positivamente a la aplicación exógena de auxinas, que promueven la respuesta de dominancia apical (Fig. 17A). Esto sugiere que la expresión de *BRC1* está controlada directa o indirectamente por auxinas y que *BRC1* podría mediar el fenómeno de dominancia apical en respuesta a esta señal hormonal. El mutante *yucca1* tiene un elevado contenido en auxinas, por lo que esperábamos encontrar unos niveles de *BRC1* más elevados que los de las plantas silvestres. Sin embargo no hemos encontrado diferencias claras en los niveles de expresión de *BRC1* entre ambos genotipos ni a nivel de ARNm (Fig. 18B) ni en las líneas  $\Delta^{1.7}pBRC1::GUS$  (Fig. 31). Finlayson (2007) tampoco encuentra en conjunto diferencias evidentes en los niveles de ARNm de *BRC1* entre *yucca1* y plantas silvestres.

#### b) Citoquininas

La aplicación de citoquininas a rosetas florecidas de *Arabidopsis* no afecta a los niveles de ARNm de *BRC1* (Fig. 19). Además, los niveles de *BRC1* tampoco están alterados de forma significativa en el mutante sobreproductor de citoquininas *amp1* (Fig. 20B) ni en las líneas  $\Delta^{1.7}pBRC1::GUS$  en fondo *amp1* (Fig. 31). Por tanto, proponemos que las citoquininas promueven el desarrollo de las yemas axilares pero no a través de la represión la transcripción de *BRC1*. Tal vez las citoquininas y *BRC1* interaccionen a otro nivel. Por ejemplo, se ha encontrado en ensayos de doble híbrido que *TCP13*, un factor de la subfamilia CIN de *Arabidopsis* (Fig. 5) interacciona con factores AHP (Suzuki *et al.*, 2001), que son intermediarios en rutas de señalización, entre ellas la de las citoquininas

(Ferreira y Kieber, 2005). Por tanto podría ocurrir que, además de las formas de acción ya comentadas, BRC1 interaccionara también con este tipo de factores, bloqueando así la correcta señalización de citoquininas en las yemas axilares inhibiendo su desarrollo. Por el momento no disponemos de ninguna evidencia genética ni molecular que apoye esta posibilidad.

### c) Ruta MAX

El estudio de las dobles mutantes *brc1 max* sugiere que *BRC1* está en la misma ruta que los genes *MAX* (Fig. 15A-C). Además los niveles de ARNm de *BRC1* en los 4 mutantes *max* están muy reducidos (Fig. 15D). Finlayson (2007) sólo estudia los niveles de *BRC1* en *max2* y también encuentra que están muy reducidos. Nosotros proponemos que *BRC1* está en la misma ruta que los genes *MAX* y por debajo de estos. En arroz no parece darse esta situación. En esta especie los niveles del homólogo de *BRC1*, *OsTb1*, no están reducidos en los mutantes *d3* y *d10*, homólogos de *max2* y *max4* respectivamente (Arite *et al.*, 2007). Esto indica que aunque las funciones génicas están conservadas, parece haber diferencias en su regulación. Esta diferente regulación puede haber dado lugar a diferencias morfológicas. Por ejemplo los mutantes *d3*, *htd1* y *d10* son, además de muy ramificados, enanos, a diferencia de los mutantes *max* (Ishikawa *et al.*, 2005; Zou *et al.*, 2006; Arite *et al.*, 2007).

Los genes *MAX* participan en una misma ruta genética en la formación y regulación de un derivado carotenoide que actuaría como represor de la ramificación axilar (McSteen y Leyser, 2005). *MAX3* y *MAX4* pertenecen a la familia de las 9-*cis*-epoxi-carotenoide dioxigenasas (NCEDs, *Nine-Cis-Epoxy-carotenoids Dioxygenases*), de las que hay 9 en *Arabidopsis* (Tan *et al.*, 2003). De ellas, 5 actúan en la síntesis de ácido abscísico y el resto, filogenética y funcionalmente separadas de estas 5, se denominan CCDs (*Carotenoid Cleavage Dioxygenases*), ya que tienen capacidad de actuar sobre carotenoides aunque no participan en la síntesis de abscísico. *MAX3* es *AtCCD7* y *MAX4* es *AtCCD8*. Las otras dos son *AtCCD1*, cuyos mutantes no afectan a la ramificación (Auldrige *et al.*, 2006b), y *AtCCD4*, de función no caracterizada (Schwartz *et al.*, 2004). *MAX3* parece actuar sobre varios carotenoides, principalmente sobre el  $\beta$ -caroteno: tanto en *E. coli* como en ensayos *in vitro* *MAX3* actúa sobre el  $\beta$ -caroteno, rompiendo la molécula en los apocarotenoides 10'-apo- $\beta$ -carotenal y el residuo  $\beta$ -ionone (Schwartz *et al.*, 2004). *MAX4* intervendría tras *MAX3* (Schwartz *et al.*, 2004; Booker *et al.*, 2004). Esta proteína sólo parece actuar sobre el 10'-apo- $\beta$ -carotenal producido por la actividad de *MAX3*, generando a su vez 13-apo- $\beta$ -carotenona y un dialdehído no caracterizado por completo (Schwartz *et al.*, 2004).

La composición del derivado carotenoide producido por la acción de *MAX4* no se conoce aún, pero es posible que tenga actividad hormonal, como la tienen el ácido abscísico, el ácido retinoico en animales o el ácido trispórico en hongos, todos derivados del  $\beta$ -caroteno (Auldrige *et al.*, 2006a). Esta nueva hormona controlaría el desarrollo de las yemas axilares a través del control indirecto de la actividad de *BRC1*. *MAX1* actúa por debajo de *MAX3/4* y codifica para *CYP711A1*, un citocromo P450 con cierta homología de secuencia con la Tromboxana A2 sintasa de mamíferos, la cual actúa tras la acción de una dioxigenasa (Booker *et al.*, 2005). Por tanto es posible que *MAX1* modifique el producto de la reacción de *MAX4*, aunque todavía no está claro. Hay que suponer que hay más

pasos modificadores en esta ruta, aunque puede que los compuestos resultantes de la acción de MAX3/4/1 sean ya biológicamente activos.

El siguiente gen caracterizado de esta ruta es MAX2, que originalmente se identificó como ORESARA9 (ORE9; *oresara* = coreano, larga vida), que también tiene un papel como regulador positivo de la senescencia foliar (Woo *et al.*, 2001). MAX2 codifica para una F-box que interacciona con los componentes ASK1 (*Arabidopsis Skp1-like 1*) y AtCUL1 del complejo SCF para señalización de proteínas para su degradación a través de la vía ubiquitin-proteasoma (Woo *et al.*, 2001; Stirnberg *et al.*, 2007). De las en torno a 700 proteínas F-box de Arabidopsis, MAX2 pertenece a la subfamilia C3, a la que también pertenecen TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1 (TIR1; Rueger *et al.*, 1998) y CORONATINE INSENSITIVE1 (COI1; Xie *et al.*, 1998). En esta subfamilia todos sus integrantes se caracterizan por tener varios dominios LRR de interacción proteína-proteína además del dominio F-box (18 en MAX2; Gagne *et al.*, 2002; Risseuw *et al.*, 2003). MAX2 debe actuar a nivel de los nudos ya que, aunque su expresión es generalizada, al poner un injerto *max2* sobre un portainjertos silvestre no se restaura el fenotipo de *max2* (Stirnberg *et al.*, 2007). Además MAX2 se localiza en el núcleo (Stirnberg *et al.*, 2007), como COI1 (Feng *et al.*, 2003) o TIR1 (Dharmasiri *et al.*, 2005). Por tanto, de momento, habría que situar a BRC1 bajo la acción de MAX2, al ser este el último gen de la ruta descrito. El hecho de que MAX2 forme parte de un complejo SCF<sup>ORE9/MAX2</sup> sugiere que la represión de las yemas axilares podría estar mediada por la acción de este complejo sobre una o varias proteínas, que serían señalizadas para su degradación. Por su parte ese complejo estaría controlado por el derivado carotenoide producido por MAX3, 4 y 1, denominado SMS (*Shoot-Multiplication Signal*, Beveridge, 2006) o MDS (*MAX-Dependent Signal*, Bennett *et al.*, 2006). El sistema hormona-complejo SCF que parece actuar en el control de la ramificación en plantas (sistema MDS-SCF<sup>MAX2</sup>) puede ser semejante a otros descritos en plantas, como los sistemas auxinas-SCF<sup>TIR1</sup> o ácido jasmónico-SCF<sup>COI1</sup> (Toman *et al.*, 2005; Quint and Gray, 2006 Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007). Es así posible que MAX2 promueva la degradación de un represor de la transcripción de BRC1 y que, en mutantes *max2*, el represor se pueda acumular causando la falta de expresión de BRC1.

#### 4. Relación de BRC1 con los estímulos luminosos e hídricos

Hemos mostrado que las plantas silvestres de Arabidopsis crecidas a alta densidad producen menos ramas RI que a baja densidad. Por su parte en los mutantes *brc1* también hay una disminución del número de ramas en crecimiento a alta densidad aunque ésta es menor (Fig. 21), por lo que los mutantes *brc1* parecen ser parcialmente insensibles a la densidad de plantación. En un ensayo similar en arroz se ha encontrado que los mutantes *fc1* responden al crecimiento en alta densidad, casi en la misma medida que las plantas silvestres (Takeda *et al.*, 2003). Esto indica que tanto en Arabidopsis como en arroz existen otros factores que actúan en el control de la ramificación a alta densidad de plantación, teniendo quizá estos factores más relevancia en arroz. En el ensayo de respuesta a sequía las plantas silvestres sometidas a estrés hídrico tienen un 73.5% de menos ramas RI, frente a un 26.6% de reducción los mutantes (Fig. 25). Esto sugiere, como en el caso del ensayo de densidad, que los mutantes *brc1* aumentan la ramificación de las plantas pero que otros reguladores de la ramificación podrían estar actuando.

*BRC1* responde a cambios en las condiciones de luz, tanto a cambios en la calidad de la luz (sus niveles de ARNm aumentan si el ratio R:RL es bajo, Fig. 22), como a cambios en la cantidad de luz (sus niveles aumentan si se disminuye esta cantidad, Fig. 24). El gen *PHYB* es el principal responsable de la percepción de la razón R:RL y el mutante *phyB* tiene una respuesta constitutiva al síndrome de huída que produce una represión en la ramificación axilar. Por ello podríamos esperar que en *phyB* los niveles de *BRC1* estuvieran aumentados respecto a los de plantas silvestres. Sin embargo no encontramos tal aumento en *phyB*, ni tampoco en *phyA* (Fig. 23) ni observamos cambios de la expresión de *GUS* en estos mutantes combinados  $\Delta^{1.7}pBRC1::GUS$ . Todavía desconocemos el origen de la regulación positiva de *BRC1* por bajo R:RL pero alguno de los otros tres fitocromos presentes en *Arabidopsis* puede tener una función en este proceso. Por el contrario en sorgo se ha demostrado que las mutaciones en *SbPHYB* sí aumentan la expresión de *SbTb1*, lo que indicaría que *SbPHYB* reprime la expresión de *SbTb1* y explicaría el fenómeno de huída de la sombra en sorgo (Kebrom *et al.*, 2006). Esto puede indicar que en sorgo la regulación de estos genes es diferente, como ya se ha descrito más arriba respecto a la regulación de *OsTb1* por los homólogos de los genes *MAX* en arroz. Además, tal vez otros receptores u otros tipos de luz tengan también un papel en el control de la ramificación. En este sentido, determinadas exposiciones a luz UV intensifican la ramificación axilar, aunque no parece una respuesta general para todas las plantas (Barnes *et al.*, 1990). En *Arabidopsis* este aspecto no parece haberse estudiado aún.

### 5. *BRC1* como integrador de señales de control de la ramificación

*BRC1* es, hasta el momento, el único gen descrito en *Arabidopsis* que actúa localmente dentro de las yemas axilares para reprimir su desarrollo y cuya regulación negativa es necesaria para permitir el crecimiento de las ramas. Además, nuestros resultados confirman que *BRC1* está controlado transcripcionalmente por estímulos endógenos (dominancia apical) y ambientales (condiciones de luz) que afectan a la dormición de las yemas. Estos resultados apoyan el papel central de *BRC1* en este proceso y sugieren la posibilidad de que este gen pueda integrar diferentes rutas de señalización que controlan la ramificación.

### 6. Regulación transcripcional

Para determinar las secuencias importantes que controlan la expresión específica de *BRC1* en yemas axilares, hemos iniciado un análisis del promotor de *BRC1*. También hemos estudiado el promotor de *BRC2*, para estudiar posibles paralelismos en la regulación de estos dos genes.

Hemos determinado que en 1.7 Kb de la región en 5' de *BRC1* están las secuencias necesarias para su expresión en yemas axilares (Fig. 28) y mediante un análisis de delección hemos acotado estas secuencias a una región de 167 pb (Fig. 34). No obstante mientras que la expresión de *BRC1* se detecta en meristemos axilares (Fig. 6A), en las líneas con la construcción  $\Delta^{1.7}pBRC1::GUS$  no observamos tinción *GUS* en meristemos axilares, ni aún cuando sobreteñimos las muestras (no mostrado). El grupo de Finlayson (Texas University) ha realizado fusiones a *GUS* utilizando ~800 pb en 5' de *BRC1* y tampoco encuentra expresión de *GUS* en meristemos axilares (com. pers.). Esto parece

indicar que las secuencias necesarias para la expresión en meristemas axilares no se encuentran en las 1762 pb en 5' de *BRC1* utilizadas. Podría ser que estas secuencias se encontraran en regiones localizadas entre el ATG y la 3'UTR, como ocurre en los genes de *Arabidopsis* *AGAMOUS* (*AG*; Sieburth y Meyerowitz, 1997), *SUPERMAN* (*SUP*; Ito *et al.*, 2003) o *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*; Sheldon *et al.*, 2002). También es posible que haya regiones reguladoras en 3' del gen, como en los genes de *Arabidopsis* *CLAVATA3* (*CLV3*; Brand *et al.*, 2002), *TERMINAL FLOWER1* (*TFL1*, F. Madueño, com. pers.) o con el propio *LATERAL SUPPRESSOR* (Eicker y Theres, 2005). Esto sería coherente con el hecho de que una construcción  $\Delta^{1.7}\text{pBRC1}::\text{BRC1}::3'\text{UTR}$  no parece rescatar el fenotipo *brc1* (nuestros resultados no mostrados). Para investigar este punto estamos estudiando inserciones de T-DNA en regiones en 3' de *BRC1*. Una de ellas, localizada a +2300 pb de la 3'UTR, no produce fenotipo de ramificación (no mostrado). La otra disponible, localizada a +800 pb, se está analizando. Otra posibilidad es que sean necesarias regiones en 5' mayores que las 1762 pb utilizadas. Por ejemplo en el control de la transcripción del gen de *Arabidopsis* *WUSCHEL* son necesarias regiones en torno a las 3000 pb en 5' (Baurle y Laux, 2005), y en torno a 5000 pb en el caso de *SUPERMAN* (Ito *et al.*, 2003). El rescate del fenotipo *brc1* con regiones genómicas mayores que las estudiadas nos ayudarán a dilucidar este punto.

El estudio filogenómico de las regiones en 5' de los genes *BRC1* de varias especies ha mostrado que hay dos tipos de secuencias altamente conservadas entre ellas, el motivo TGTCTTTCTC y repeticiones de TCs (Fig. 38). La secuencia TGTCTTTCTC puede considerarse formada por dos elementos de respuesta a auxinas no canónicos y solapados. El elemento canónico es TGTCTC, y en él el primer dinucleótido TC es el que debe permanecer invariable (Liu *et al.*, 1994), condición que se cumple en este caso. Los elementos de respuesta a auxina suelen ser compuestos, y estar formados por un elemento constitutivo y otro inducible, TGTCTC, que es el que responde a auxinas (Ulmasov *et al.*, 1995). El elemento constitutivo puede a su vez estar separado o solapado con el de respuesta a auxinas. Un ejemplo de esta última clase es el elemento de respuesta D1 del promotor del gen *GH3* de soja, cuya secuencia es CCTCGT*GTCTC*, en el que subrayado se indica el elemento constitutivo y en cursiva el de respuesta a auxina (Ulmasov *et al.*, 1995). La secuencia caracterizada por nosotros podría interpretarse como otro ejemplo en esta clase de elementos en *cis* que en este caso sería TGTCT*TTTCTC*. Para determinar la funcionalidad de esta secuencia conservada, en el laboratorio se están generando plantas transgénicas con construcciones del promotor de *BRC1* fusionadas a *GUS* en las que se han mutagenizado determinadas bases de dicha secuencia conservada.

A la secuencia TGTCTC se unen factores ARF (Hagen y Guilfoyle, 2002), de los que hay 23 en *Arabidopsis* (Okushima *et al.*, 2005). Hay caracterizados mutantes sencillos para todos ellos. Los mutantes *arf1* a *arf8*, *arf10*, *arf16*, *arf17* y *arf19*, por separado o en combinación con otro mutante de entre estos, presentan fenotipo alterado, muchas veces pleiotrópico, aunque no está descrito que afecten a la ramificación. Las mutaciones simples del resto, *arf9*, *arf11* a *arf15*, *arf18* y *arf20* a *arf22* no muestran fenotipo mutante (Okushima *et al.*, 2005 y referencias allí citadas), aunque tal vez algunos dobles mutantes pudieran tener el patrón de ramificación alterado. Hemos mostrado que en plantas con la construcción  $\Delta^{1.7}\text{pBRC1}::\text{GUS}$  la aplicación de auxinas aumenta los niveles de *GUS* (Fig. 29A). Ahora estamos investigando si las construcciones  $\Delta^{0.5}\text{pBRC1}::\text{GUS}$  y

$\Delta^{0.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$  tienen también este tipo de respuesta. Por otra parte los elementos TGTCTC no sólo responden a auxinas. Así, genes o construcciones inducibles por auxinas también lo son por brasinosteroides, y estos genes están enriquecidos en la secuencia nuclear TGTC (Nakamura *et al.*, 2003; Nemhauser *et al.*, 2004).

No obstante, la secuencia conservada tanto en mono como en dicotiledóneas es TCTTT (Fig. 38), donde CTTT es la secuencia nuclear de unión para factores DOF. Las proteínas DOF son específicas de plantas (hay 36 en *Arabidopsis*) y participan en diversos procesos: formación de semillas, defensa, metabolismo de glucosinolatos y flavonoides o en respuesta a fitohormonas como las auxinas (Baumann *et al.*, 1999; Yanagisawa, 2002; Skirycz *et al.*, 2006; Skirycz *et al.*, 2007). Las secuencias flanqueantes a CTTT parecen tener importancia para la acción de estos factores (Yanagisawa y Schmidt, 1999). En *Arabidopsis* se han descrito dos genes *DOF* cuya sobreexpresión tiene efectos opuestos sobre la ramificación: las plantas que sobreexpresan *AtDOF4;2* (At4g21030) son más ramificadas que las silvestres (Skirycz *et al.*, 2007), mientras que las que sobreexpresan *AtDOF1.1* (At1g07640) apenas ramifican (Skirycz *et al.*, 2006). En ambos casos hay asociadas otras alteraciones.

Hemos probado que *BRC1* responde a distintos tratamientos de luz (Figs. 22 y 24), aunque si esta respuesta ocurre a nivel transcripcional no se encuentra localizada en la región -1.7 Kb del ATG de *BRC1* ya que la construcción  $\Delta^{1.7}\text{pBRC1}::\text{GUS}$  no responde a cambios lumínicos. Hemos encontrado varias *G-boxes* e *I-boxes* entre -600 y -700 pb del ATG de *BRC1*, pero estos elementos de respuesta a luz no están conservados en los promotores de las distintas especies estudiadas (no mostrado). Por otro lado, en el elemento TGTCTTTCTC conservado entre los diversos promotores de *BRC1*, la secuencia CTTT (consenso de unión de factores DOF, ver más arriba) es también semejante a un elemento también de respuesta a luz descrito para los factores TRIHELIX (23 en *Arabidopsis*, <http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v1.0/>), la caja GT-1 GAAAA (o CTTTT), aunque estas cajas suelen encontrarse repetidas o en combinación con otros elementos de respuesta a luz (Buchel *et al.*, 1999; Zhou, 1999; Park *et al.*, 2004).

En cuanto a las repeticiones de dinucleótidos TC, están caracterizadas como intensificadoras de la activación transcripcional (Pauli *et al.*, 2004). A ellas se unen al menos los factores BBR/BPC, específicos de plantas, de los que hay 7 en *Arabidopsis* que actúan en promotores de genes necesarios para la formación de tetrapirroles, para el desarrollo del óvulo o para el mantenimiento y el desarrollo de primordios de hoja (Sangran y O'Brian, 2002; Santi *et al.*, 2003; Meister *et al.*, 2004; Kooiker *et al.*, 2005). En *Drosophila* el factor TRITHORAX-LIKE/GAGA FACTOR (TRL/GAF) se une también a estas secuencias, actuando como activador de la transcripción génica, permitiendo el acceso a la cromatina de factores de transcripción generales (Farkas *et al.*, 2002; Leibovitch *et al.*, 2002). En forma similar actúan factores GAF en mamíferos (Volpi *et al.*, 2002). Los factores BBR/BPC podrían ser homólogos funcionales (que no de secuencia) de los factores TRL/GAF (Santi *et al.*, 2003). Los mutantes sencillos para los genes *BBR/BPC* caracterizados no presentan fenotipos mutantes (Wanke *et al.*, 2007).

Uno de los principales objetivos del análisis del promotor de *BRC1* era identificar los factores de transcripción que controlan su expresión en yemas axilares. Utilizando

algunas de las regiones identificadas como necesarias hemos realizado un análisis de híbrido sencillo para encontrar proteínas que reconozcan estas secuencias. En este ensayo se obtuvieron clones de *AtMYB21*, *VRN2* y un gen de la familia DDT.

*AtMYB21* actúa durante el desarrollo de las flores y no está descrito que sus mutaciones produzcan plantas más ramificadas aunque sí plantas con elevada esterilidad masculina (Mandaokar *et al.*, 2006). Por otro lado, las plantas que sobreexpresan *AtMYB21* son poco ramificadas, pero también tienen afectados otros aspectos del desarrollo (Shin *et al.*, 2002). El gen más relacionado con *AtMYB21* es *AtMYB24*, cuyos mutantes no presentan fenotipo alterado (Mandaokar *et al.*, 2006). Su sobreexpresión produce alteraciones en la dehiscencia del polen y plantas muy poco ramificadas (Yang *et al.*, 2007). Mutaciones en *AtMYB2* (bastante relacionado filogenéticamente con *AtMYB21* y *AtMYB24*, Stracke *et al.*, 2001) generan plantas muy ramificadas y con fertilidad reducida (Guo y Gan, 2007). Recientemente se ha descrito que algunos factores MYB interaccionan con factores ARF en la modulación de la respuesta a auxinas (Shin *et al.*, 2007). Un sitio de unión para factores MYB es AACC (Romero *et al.*, 1998; Shin *et al.*, 2007), presente en *BRC1* y en todas las especies herbáceas de entre las analizadas (Fig. 38) justo tras la secuencia conservada TGTCTTTCTC, salvo en arroz donde hay varias secuencias AACC pero algo más alejadas (no mostrado).

Respecto al factor *VRN2* y al perteneciente al grupo DDT (*At5g22760*), se podría establecer cierto paralelismo con la situación de la represión del gen *FLC* (Sung y Amasino, 2004). El factor DDT (*At5g22760*) tiene 4 dominios PHD además del dominio DDT, según SEQUEROME™. Se cree que el dominio DDT es de unión a ADN (Doerks *et al.*, 2001), mientras que el dominio PHD es de interacción con proteínas, principalmente histonas (Bienz, 2006) y puede ser necesario para la activación transcripcional (Halbach *et al.*, 2000). El producto del gen con dominio PHD *VIN3* (*VERNALIZATION INSENSITIVE3*), que se expresa de forma específica y transitoria, es necesario para iniciar el silenciamiento de *FLC* y actúa reclutando a *VRN2*, presente de forma más constitutiva, junto a otras proteínas del grupo *Polycomb* (*PcG*), que son necesarias para mantener silenciado a *FLC* (Sung y Amasino, 2004). No está determinada la especificidad de unión a ADN de *VIN3* o de *VRN2*. *VRN2* tiene un dominio de dedo de zinc, que puede unirse a ADN, pero también a ARN o interaccionar con proteínas (Englbrecht *et al.*, 2004). El homólogo en *Drosophila* de *VRN2* es *Suz(12)* (*Suppressor of Zeste 12*), que tiene una función de histona metiltransferasa pero no parece unirse a ADN. Sin embargo otras proteínas del grupo *Polycomb* de *Drosophila* como *Pleiohomeotic* (*Pho*) sí se unen a ADN. Además, otra secuencia, GAAAA (o CTTTT), es necesaria para la unión del factor tipo HMG *Dorsal switch protein1* (*DSP1*) para que de esta forma se recluten complejos *Polycomb* (Dejardin *et al.*, 2005). Dicha secuencia es semejante a la secuencia conservada descrita por nosotros TGTCTTTCTC y que está presente en todos los promotores de *BRC1* de las especies estudiadas (no mostrado). No está descrito que las mutaciones en *VRN2* afecten al patrón de ramificación (Chandler *et al.*, 1996; Gendall *et al.*, 2001). En cambio, la sobreexpresión de *FERTILISATION INDEPENDENT ENDOSPERM* (*FIE*), un factor *Polycomb* que forma parte del complejo *PCR2 VRN2*, sí produce plantas más ramificadas, junto con otras alteraciones en el desarrollo (Katz *et al.*, 2004; Wood *et al.*, 2006).



Tatematsu *et al.* (2005) llevaron a cabo un análisis transcriptómico para determinar la riqueza relativa en secuencias reguladoras de genes sobreexpresados y reprimidos en yemas axilares después de decapitar plantas de *Arabidopsis*. Determinaron que los promotores de genes reprimidos tras la decapitación estaban enriquecidos en TTATCC, mientras que los de los genes sobreexpresados lo estaban en GGCCCAWW y en AAACCCTA. Hemos mostrado que la decapitación produce una bajada en los niveles de ARNm de *BRC1* (Fig. 17), por lo que *BRC1* estaría en el primer grupo de genes. Como *BRC1* actúa reprimiendo la elongación de yemas axilares es posible que su regulación negativa sea necesaria para se induzcan los genes del segundo grupo (Tatematsu *et al.* 2005). En el microchip utilizado no estaba *BRC1*. Es interesante destacar que a -35 pb del ATG de *BRC1* hay un sitio AAACCCTA (típico de genes que se activan tras la decapitación), en orientación reversa. Este sitio está conservado en las especies de *Arabidopsis* analizadas pero no en *Brassica rapa* ni el resto de especies estudiadas (no mostrado).

En maíz se han realizado algunas investigaciones acerca de la regulación de *Teosinte branched1*, el primer gen de tipo *BRC1* descrito, aunque más enfocados hacia su relación con el estudio de los procesos de evolución de las plantas cultivadas. *Tb1* es un gen sobre el que se ha ejercido presión selectiva durante la domesticación del maíz (Doebley *et al.*, 1995), pero no sobre su zona codificante sino sobre sus zonas reguladoras: mientras que el grado de polimorfismo de la zona codificante de *Tb1* es similar en el maíz cultivado (*Zea mays* ssp. *mays*) y en sus ancestros silvestres los teosintes (*Z. mays* ssp. *parviglumis* y *mexicana*) el grado de polimorfismo de la región reguladora del maíz es mucho menos polimórfica que la de los teosintes (Wang *et al.*, 1999). Sin embargo hay secuencias reguladoras de teosintes que son muy semejantes a las de los maíces cultivados, por lo que podrían ser necesarias (Pääbo, 1999). El genoma de maíz es relativamente grande (~2500 Mb, unas 20 veces mayor que el de *Arabidopsis*) y tiene un elevado número de elementos transponibles (SanMiguel *et al.*, 1996). Mientras que en *Arabidopsis* la región intergénica entre *BRC1* y su gen aguas arriba es de 6 Kb (Fig. 28A), la que hay entre *Tb1* y su gen inmediato en 5' comprende 161 Kb y tiene varios transposones (Clark *et al.*, 2004). Clark *et al.* (2006) muestran que hay una región responsable del patrón de ramificación (carácter número de hijuelos por planta) situada entre 41 y 69 kb en 5' de *Tb1*. En arroz, con ~440 Mb y alrededor de un cuarto de su genoma con origen en transposones (Yu *et al.*, 2002), la distancia entre *OsTb1* y su gen inmediato aguas arriba es de 37256 pb (no mostrado) y no se sabe si esta región encontrada en maíz está también presente en arroz.

En maíz, se ha identificado otro QTL (QTL 3L) relacionado con el control de la ramificación, que sería epistático sobre *Tb1* y que podría actuar como un regulador aguas arriba de *Tb1* (Doebley *et al.*, 1995; Lukens y Doebley, 1999). Gallavotti *et al.* (2004) han determinado que *BARREN STALK1* (*BA1*) podría ser un gen candidato para este QTL 3L, ya que está asociado a esa misma región. El mutante *ba1* es epistático sobre *tb1* y en *ba1* también los niveles de *Tb1* están reducidos respecto al de plantas silvestres. *BA1* es homólogo de *LAX PANICLE* (*LAX*) de arroz (Komatsu *et al.*, 2003), y tiene funciones semejantes a *BA1*. Ambos codifican para factores bHLH que no tienen un homólogo funcional reconocido en *Arabidopsis*; los genes más relacionados son At5g01310 (Komatsu

*et al.*, 2003), At5g67070, At3g50330, At5g09750 y At3g21330, por este orden y según análisis BLASTP en el NCBI, de los que no hay datos salvo que pertenecen a la subfamilia 19 de los factores bHLH que contiene a *INDEHISCENT* (*IND*, At4g00120), un gen necesario para el desarrollo del fruto, siendo At5g01310 el más separado de esta subfamilia (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003; Liljegren *et al.*, 2004). Es posible que alguno de estos genes afecte a la regulación de *BRC1* en *Arabidopsis* pero este punto todavía no ha sido investigado.

Por otra parte, hemos mostrado que *BRC1* no parece estar autorregulado, ya que en plantas mutantes *brc1* con la construcción  $\Delta^{1.7}\text{pBRC1}::\text{GUS}$  observamos niveles de tinción GUS en yemas axilares comparables a los de plantas silvestres (Fig. 31) y los niveles de GUS son comparables a los de *BRC1* (Fig. 32). Esto es consistente con el hecho de que en el promotor de *BRC1* no aparecen sitios de unión de proteínas TCP, ni de clase II (Fig. 5) que se unen a sitios  $\text{G}^{\text{T}}/\text{cGGNCCC}$ , ni de clase I que se unen a sitios  $\text{GGNCCCAC}$  (Kosugi y Ohashi, 2002). En las regiones entre los genes adyacentes a *BRC1* (Fig. 28A) sólo hay un sitio para un gen de clase I a 7512 pb en 3' de *BRC1* (no mostrado).

En cuanto a la regulación transcripcional de *BRC2*, hemos iniciado el análisis del promotor de *BRC2* y hemos determinado que en *Arabidopsis* las regiones importantes que controlan su regulación están circunscritas a la región entre -1500 y -1388 pb del ATG (Fig. 43). Su regulación parece ser muy divergente de la de *BRC1*, el patrón de expresión de GUS no es el mismo, aunque puede que haya zonas fuera de las 1.7 KB del promotor de *BRC2* que confieran expresión en las yemas. Además, las zonas reguladoras caracterizadas en *BRC2* están más distantes del ATG que las de *BRC1*. Se precisan no obstante más estudios para caracterizar mejor la regulación de *BRC2*.

## 7. Regulación post-transcripcional

Hemos probado que los niveles de expresión de *BRC1* están muy reducidos en los mutantes *max* (Fig. 15D). Esto podría indicar que los genes *MAX* controlan la transcripción de *BRC1*, por acción sobre sus zonas reguladoras. Sin embargo en mutantes *max* que llevan la construcción  $\Delta^{1.7}\text{pBRC1}::\text{GUS}$  los niveles de expresión de GUS son semejantes a los de plantas silvestres que llevan esta fusión (Figs. 31 y 32). Esto sugiere que el control de los genes *MAX* sobre *BRC1* podría ser a nivel post-transcripcional. Una posibilidad es que MAX2 señale algún componente que afecte al metabolismo del ARN y que los cambios observados se deban a cambios en la estabilidad del ARNm de *BRC1*.

La expresión génica puede ser regulada por la desestabilización selectiva del ARNm y está facilitada por determinadas secuencias características en la región 3' UTR a las que se unen ciertos factores que controlan su (des)estabilización (Gutierrez *et al.*, 1999; Wilusz y Wilusz, 2004). Por ejemplo los factores AUF1 se unen a elementos ricos en AU (*ARE elements*) del ARNm controlando su estabilidad (Brewer, 1991). Se ha mostrado que este control está mediado por la degradación de AUF1 vía ubiquitin-proteasoma (Laroia *et al.*, 1999; Laroia *et al.*, 2002; Laroia y Schneider, 2002). En algún caso se ha probado la asociación de una F-box con una proteína de unión a estas secuencias reguladoras en *cis* del ARNm (Clifford *et al.*, 2000; Lakiza *et al.*, 2005). Por otra parte la estabilidad del ARNm está controlada en algunos casos por niveles de algunas hormonas, como el

derivado carotenoide ácido retinoico (Crowe, 1993; Zhou *et al.*, 1994), la hormona luteinizante (Nair *et al.*, 2002) u otras (revisado en Staton *et al.* 2000).

El elemento importante en la región rica en AU es AUUUA, y en general suele ser una región rica en Ues (Gutierrez *et al.*, 1999). La región 3'UTR de *BRC1* es relativamente pequeña (58 pb) y en ella hay un elemento AUUUA y un 37% en Ues (no mostrado) por lo que el ARNm de *BRC1* podría ser diana de este tipo de regulación. De todas formas no todos estos factores que controlan la estabilidad del ARNm se unen a regiones en 3'UTR ni a secuencias ricas en AU (Gutierrez *et al.*, 1999). Es posible que SCF<sup>MAX2</sup> en presencia de MDS señale para su degradación a un desestabilizador del ARNm. En ausencia de MDS o de MAX2, no se degradaría al desestabilizador y éste haría que el ARNm de *BRC1* se degradara más rápido. Recientemente se ha realizado una contribución que parece apuntar en este sentido: una proteína F-box, *KFR1* (*Kelch domain F-box RNA-associated protein1*), parece regular post-transcripcionalmente y en respuesta a estímulos lumínicos los niveles de ARNm de *Lhcb* (*Light-harvesting, chlorophyll-binding*) (Madzima *et al.*, 2007).

Para estudiar esta posible regulación post-transcripcional de *BRC1* se están realizando fusiones a *GUS* del promotor de *BRC1* junto a su región 3'UTR y zona codificantes para determinar la vida media de los transcritos producidos en mutantes *max*.

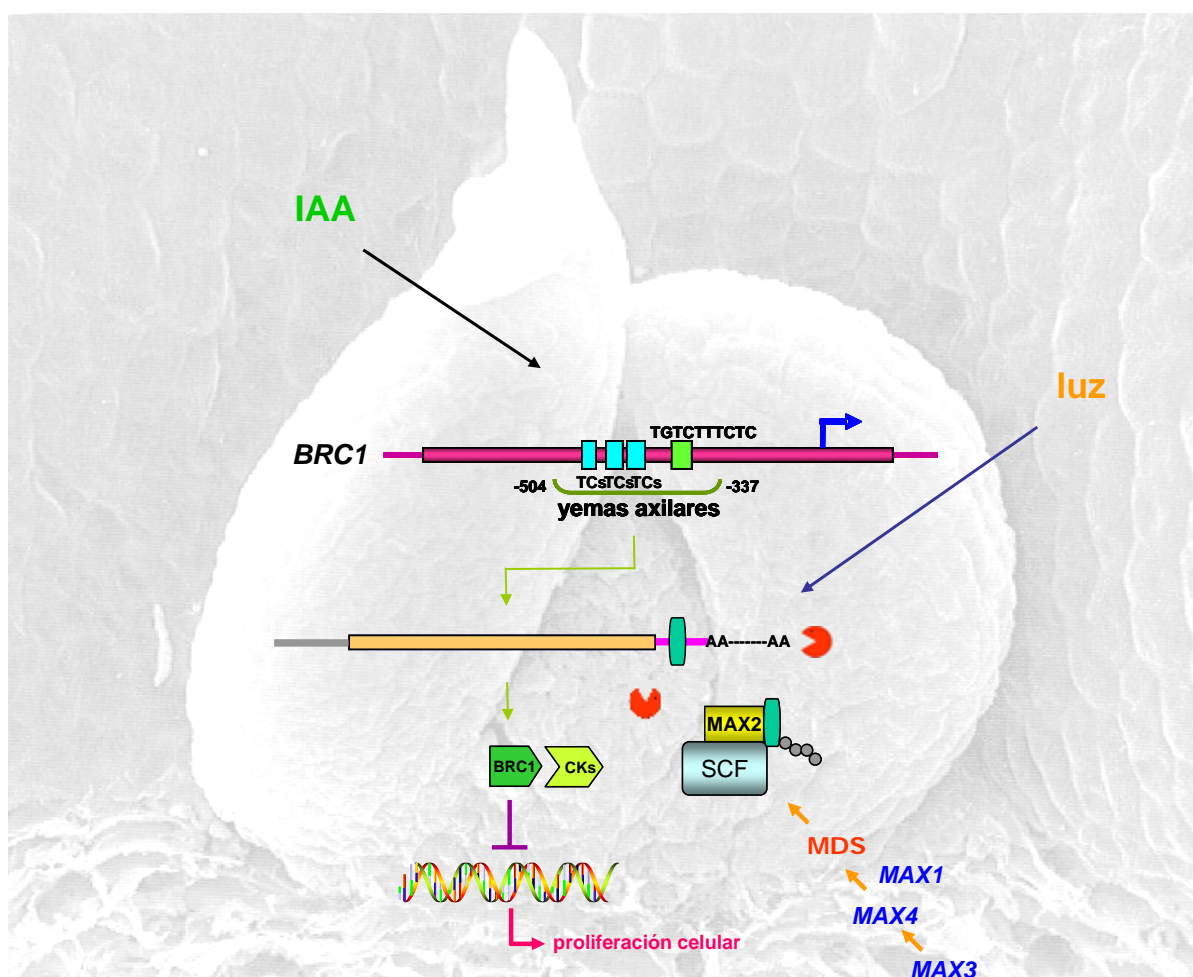
También hemos mostrado que distintas condiciones de calidad y cantidad de luz alteran la expresión de *BRC1* (Figs. 22 y 24) y que sin embargo estas condiciones no afectan a la expresión de *GUS* en líneas con la construcción  $\Delta^{1.7}$  p*BRC1::GUS* (Fig. 29). Esto puede deberse a que las secuencias responsables de la respuesta a las distintas condiciones de luz no estén en las 1762 pb en 5' de *BRC1* estudiadas. También podría ser que en estas condiciones la estabilidad del ARNm de *BRC1* sea mayor.

Esta regulación post-transcripcional por luz podría ocurrir por una vía independiente de la descrita para MAX2 o a través de la misma vía. Esta segunda opción está apoyada por el hecho de que uno de los fenotipos de *max2*, además de su exceso de ramificación, es que las plántulas presentan hipocotilos y pecíolos de los cotiledones elongados al crecer en luz blanca pero no en oscuridad lo que indica que este gen media respuestas relacionadas con la luz (Stirnberg *et al.*, 2002). Para distinguir entre estas dos opciones estamos estudiando si, en mutantes *max2*, los niveles del ARNm de *BRC1* en un bajo ratio R:RL suben como en plantas silvestres, son tan bajos como los de los mutantes *max2* crecidos en luz blanca o son intermedios entre estas dos condiciones.

### 8. Modelo de acción de *BRC1*

Según los resultados obtenidos hasta ahora podemos proponer un modelo sobre cómo actúa *BRC1* en el control del desarrollo de las yemas axilares en *Arabidopsis* (Fig. 45). Las auxinas controlarían la transcripción de *BRC1* a través de los elementos en *cis* caracterizados entre -500 y -337pb del ATG de *BRC1*. Un determinado factor podría unirse al ARNm de *BRC1* reduciendo su estabilidad. En presencia del regulador MDS, el sistema SCF<sup>MAX2</sup> señalaría para su degradación a este factor inestabilizador del mensajero haciendo el ARNm de *BRC1* más estable. Una vez traducido el ARNm se produciría proteína *BRC1* que migraría al núcleo (Fig. 7) y actuaría como factor de transcripción, bien activando genes que bloquean la división celular o reprimiendo genes que la promueven. En paralelo, tal vez podría interferir con la ruta de señalización de citoquininas, impidiendo así la proliferación celular promovida por esta hormona. Estas

acciones tendrían como efecto la represión del desarrollo de las yemas axilares y de la elongación de ramas.



**Figura 45.** Modelo de acción de *BRC1* en el control del desarrollo de las yemas axilares. Las auxinas controlan la expresión de *BRC1* (barra fucsia) a través de elementos en *cis* (repeticiones de TCs, en azul, y la secuencia TGTCTTTCTC en verde). Al ARNm producido (5'UTR en gris, secuencia codificante en naranja, 3'UTR en rosa) se une un factor (rectángulo verde) que promueve su degradación (pacmans rojos). En presencia del regulador MDS producido por los genes *MAX3*, *4* y *1*, el sistema *SCF*<sup>MAX2</sup> adicionalmente ubiquitina (círculos grises) al factor de unión al ARNm señalándolo para su degradación. El factor *BRC1* producido interfiere con la proliferación celular posiblemente a nivel transcripcional reprimiendo genes que promueven la proliferación celular. Tal vez *BRC1* también interfiera con la ruta de señalización de las citoquininas (CKs) retrasando así la proliferación celular y reprimiendo el crecimiento de las yemas axilares.

## 9. Conservación de la función de *BRC1* en angiospermas

En dicotiledóneas el primer gen tipo *BRC1* caracterizado es el de *Arabidopsis*, presentado en este trabajo. En monocotiledóneas se han estudiado con cierto detalle otros dos genes tipo *BRC1*, *Tb1* de maíz (Doebley *et al.*, 1997; Hubbard *et al.*, 2002) y *OsTb1* de arroz (Takeda *et al.*, 2003). En los tres casos estos genes actúan reprimiendo el desarrollo de las yemas axilares, por lo que su papel parece estar muy conservado en

angiospermas, aunque el gen *OsTb1* en arroz parece tener un efecto menor sobre la ramificación que *Tb1* en maíz. También parece haber diferencias entre los patrones de ramificación de arroz y maíz (especies que se separaron hace en torno a 80 m.a., Prasad *et al.*, 2005): en arroz hay ramificación basal pero no en nudos más apicales, mientras que en maíz no hay ramificación basal y apical. Las plantas silvestres de arroz tienen más de un hijuelo por individuo mientras que las de maíz sólo tienen uno (Fig. 4; Doebley *et al.*, 1997; Luo *et al.*, 2001; Hubbard *et al.*, 2002; Goto *et al.*, 2005; Doust, 2007).

En cuanto a otras dicotiledóneas, hemos mostrado que las regiones reguladoras de *BRC1* de *Arabidopsis* son activas en tomate (Fig. 39) y patata (Fig. 40). A partir de estos estudios de expresión heteróloga de *BRC1* se están caracterizando los genes tipo *BRC1* de estas especies. Sería interesante determinar si los genes tipo *BRC1* tienen alguna función en la dormición de yemas de invierno típicas de plantas perennes de zonas de clima templado. En relación con esto estamos caracterizando a los homólogos de *BRC1* en chopo (*PBRC11* y *PBRC12*), determinando sus patrones de expresión y generando plantas transgénicas para silenciar estos genes. Sin embargo hay que tener en cuenta que la estructura de una yema invernal es muy especializada. Por ejemplo, al menos los perfiles, las dos primeras hojas externas de la yema (Fig. 3B), o también las estípulas, están muy modificadas en estas yemas de invierno, ya que previenen la desecación y la pérdida de calor, restringen el movimiento de oxígeno al interior de la yema y acumulan inhibidores de crecimiento, en forma similar a las cubiertas de las semillas (Goffinet y Larson, 1982; Myking, 1997), órganos evolutivamente hablando posteriores a las yemas (Crabbé, 1994). Además en las plantas el proceso de dormición altera de forma profunda su estado fisiológico y metabólico (Schrader *et al.*, 2004). Todo esto indica que en el desarrollo y la dormición de las yemas invernales probablemente participen otras rutas genéticas aún no caracterizadas en herbáceas.

## **Conclusiones**

1. *BRC1* es el homólogo funcional de *Tb1* de maíz. Es el único factor descrito hasta ahora en *Arabidopsis* que actúa de forma específica en las yemas axilares retrasando su desarrollo e inhibiendo la elongación de ramas.
2. *BRC2* también ejerce un cierto control del desarrollo de las yemas axilares pero su efecto es sólo aparente en día corto.
3. *BRC1* y *BRC2* codifican para factores que actúan en el núcleo celular.
4. La acción de *BRC1* provoca un retraso o arresto de la proliferación celular en todos los tejidos en los que se expresa.
5. *LAS* e *IFL* son epistáticos sobre *BRC1*. *BRC1* está controlado positivamente por la ruta de los genes *MAX*. Posiblemente esta ruta actúa a través de *BRC1* para llevar a cabo su función.
6. Los niveles del ARNm de *BRC1* responden a estímulos endógenos (dominancia apical) y ambientales (calidad y cantidad de luz) que controlan la ramificación y *BRC1* es necesario para la respuesta a estos estímulos.
7. Las auxinas, mediadoras de la dominancia apical, controlan la transcripción de *BRC1*. Las citoquininas, antagonistas de la función de *BRC1*, no parecen afectar su transcripción.
8. La función de *BRC1* podría estar controlada a nivel post-transcripcional por los genes *MAX* y por cambios en la cantidad y calidad de luz.
9. Los elementos necesarios para la expresión en yemas axilares de *BRC1* están localizados entre -504 pb y -337 pb del principio de traducción. Esta región contiene la secuencia TGCTCTTTCTC y repeticiones de TCs altamente conservadas en los promotores de genes tipo *BRC1* de otras especies.
10. La región entre -1500 pb y -1388 pb en 5' del ATG de *BRC2* es necesaria para su expresión en yemas axilares.

## **Bibliografía**





- Aguilar-Martínez, J.A., Poza-Carrion, C., and Cubas, P.** (2007). Arabidopsis BRANCHED1 Acts as an Integrator of Branching Signals within Axillary Buds. *Plant Cell* **19**, 458-472.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., and Ecker, J.R.** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science* **301**, 653-657.
- Aphalo, P., Ballare, C., and Scopel, A.** (1999). Plant-plant signalling, the shade-avoidance response and competition. *J. Exp. Bot.* **50**, 1629-1634.
- Arite, T., Iwata, H., Ohshima, K., Maekawa, M., Nakajima, M., Kojima, M., Sakakibara, H., and Kyojuka, J.** (2007). DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J.*
- Arnosti, D.N.** (2003). ANALYSIS AND FUNCTION OF TRANSCRIPTIONAL REGULATORY ELEMENTS: Insights from Drosophila. *Annual Review of Entomology* **48**, 579-602.
- Auldrige, M.E., McCarty, D.R., and Klee, H.J.** (2006a). Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 315-321.
- Auldrige, M.E., Block, A., Vogel, J.T., Dabney-Smith, C., Mila, I., Bouzayen, M., Magallanes-Lundback, M., DellaPenna, D., McCarty, D.R., and Klee, H.J.** (2006b). Characterization of three members of the Arabidopsis carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. *Plant J* **45**, 982-993.
- Baba, K., Nakano, T., Yamagishi, K., and Yoshida, S.** (2001). Involvement of a nuclear-encoded basic helix-loop-helix protein in transcription of the light-responsive promoter of psbD. *Plant Physiol* **125**, 595-603.
- Babb, S., and Muehlbauer, G.** (2003). Genetic and morphological characterization of the barley unculm2 (cul2) mutant. *Theoretical and Applied Genetics* **106**, 846 - 857.
- Bączek-Kwinta, R., Filek, Grzesiak, S., T. Hura, T.** (2006). The effect of soil drought and rehydration on growth and antioxidative activity in flag leaves of triticale. *Biologia Plantarum* **50**, 55-60.
- Ballas, N., Wong, L-M. and Theologis, A.** (1993). Identification of the Auxin-responsive Element, AuxRE, in the Primary indoleacetic Acid-inducible Gene, PS-IAA4/5, of Pea (*Pisum sativum*). *Journal of Molecular Biology* **233**, 580-596.
- Bandurski, R.S., and Schulze, A.** (1977). Concentration of Indole-3-acetic Acid and Its Derivatives in Plants. *Plant Physiol.* **60**, 211-213.
- Bangerth, F.** (1994). Response of cytokinin concentration in the xylem exudate of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to decapitation and auxin treatment, and relationship to apical dominance. *Planta* **194**, 439 - 442.
- Bangerth, F., Li, C.-J., Gruber, J.** (2000). Mutual interaction of auxin and cytokinins in regulating correlative dominance. *Plant Growth Regulation* **32**, 205 - 217.
- Barisčić, N., Stojković, B. and Tarasjev, A.** (2006). Plastic responses to light intensity and planting density in three *Lamium* species. *Pl. Syst. Evol.* **262**, 25-36.
- Barnes, P.W., S. D. Flint, and M. M. Caldwell.** (1990). Morphological responses of crop and weed species of different growth forms to ultraviolet-B radiation. *American Journal of Botany* **77**, 1354-1360.
- Barton, M.K., and Poethig, R.S.** (1993). Formation of the shoot apical meristem in Arabidopsis thaliana: an analysis of development in the wild type and in the shoot meristemless mutant. *Development* **119**, 823-831.
- Baumann, K., De Paolis, A., Costantino, P., and Gualberti, G.** (1999). The DNA Binding Site of the Dof Protein NtBBF1 Is Essential for Tissue-Specific and Auxin-Regulated Expression of the rolB Oncogene in Plants. *Plant Cell* **11**, 323-334.
- Baurle, I., and Laux, T.** (2005). Regulation of WUSCHEL transcription in the stem cell niche of the Arabidopsis shoot meristem. *Plant Cell* **17**, 2271-2280.
- Benet T., and Leyser O.** (2006). Something on the side: axillary meristems and plant development. *Plant Molecular Biology* **60**, 843-854.
- Benjamins, R., Quint, A., Weijers, D., Hooykaas, P., and Offringa, R.** (2001). The PINOID protein kinase regulates organ development in Arabidopsis by enhancing polar auxin transport. *Development* **128**, 4057-4067.
- Benner, B.I.** (1988). Effects of Apex Removal and Nutrient Supplementation on Branching and Seed Production in *Thlaspi arvense* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **75**, 645-651.
- Bennett, T., Sieberer, T., Willett, B., Booker, J., Luschnig, C., and Leyser, O.** (2006). The Arabidopsis MAX pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Curr Biol* **16**, 553-563.
- Bernatzky, R., Tanksley, S. D.** (1986). Genetics of actin-related sequences in tomato. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **72**, 314 - 321.
- Beveridge, C.A.** (2006). Axillary bud outgrowth: sending a message. *Curr Opin Plant Biol* **9**, 35-40.

- Beveridge, C.A., Weller, J.L., Singer, S.R., and Hofer, J.M.I. (2003). Axillary Meristem Development. Budding Relationships between Networks Controlling Flowering, Branching, and Photoperiod Responsiveness. *Plant Physiol.* **131**, 927-934.
- Bienz, M. (2006). The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends in Biochemical Sciences* **31**, 35.
- Blake, T.J., Reid, D.M., and Rood, S.B. (1983). Ethylene, indoleacetic acid and apical dominance in peas: A reappraisal. *Physiologia Plantarum* **59**, 481-487.
- Blakeslee, J.J., Peer, W.A., and Murphy, A.S. (2005). Auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 494.
- Blázquez, M.A. (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Bonetta, D., Bayliss, P., Sun, S., Sage, T., and McCourt, P. (2000). Farnesylation is involved in meristem organization in *Arabidopsis*. *Planta* **211**, 182-190.
- Bonser, S.P., and Aarssen, L.W. (2001). Allometry and plasticity of meristem allocation throughout development in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Ecology* **89**, 72-79.
- Booker, J., Chatfield, S., and Leyser, O. (2003). Auxin acts in xylem-associated or medullary cells to mediate apical dominance. *Plant Cell* **15**, 495-507.
- Booker, J., Auldrige, M., Wills S, McCarty, D., Klee, H., and Leyser, O. (2004). MAX3/CCD7 Is a Carotenoid Cleavage Dioxygenase Required for the Synthesis of a Novel Plant Signaling Molecule. *Current Biology* **14**, 1232-1238.
- Booker, J., Sieberer, T., Wright, W., Williamson, L., Willett, B., Stirnberg, P., Turnbull, C., Srinivasan, M., P, G., and Leyser, O. (2005). MAX1 Encodes a Cytochrome P450 Family Member that Acts Downstream of MAX3/4 to Produce a Carotenoid-Derived Branch-Inhibiting Hormone. *Developmental Cell* **8**, 443-449.
- Brand, U., Grunewald, M., Hobe, M., and Simon, R. (2002). Regulation of CLV3 Expression by Two Homeobox Genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **129**, 565-575.
- Bredmose, N., Kristiansen, K., Nørbaek, R., Christensen, L., Hansen-Møller, J. (2005). Changes in Concentrations of Cytokinins (CKs) in Root and Axillary Bud Tissue of Miniature Rose Suggest that Local CK Biosynthesis and Zeatin-Type CKs Play Important Roles in Axillary Bud Growth. *Journal of Plant Growth Regulation* **24**, 238 - 250.
- Brewer, G. (1991). An A + U-rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2460-2466.
- Brzeski, J., Podstolski, W., Olczak, K., and Jerzmanowski, A. (1999). Identification and analysis of the *Arabidopsis thaliana* BSH gene, a member of the SNF5 gene family. *Nucleic Acids Res* **27**, 2393-2399.
- Brown, B.T., Foster, C., Phillips, J. N., Rattigan, B. M. (1979). The indirect role of 2,4-D in the maintenance of apical dominance in decapitated sunflower seedlings (*Helianthus annuus* L.). *Planta* **146**, 475 - 480.
- Buchel, A.S., Brederode, F.T., Bol, J.F., Linthorst, J.M. (1999). Mutation of GT-1 binding sites in the Pr-1A promoter influences the level of inducible gene expression in vivo. *Plant Molecular Biology* **40**, 387-396.
- Busso, C.A., and Richards, J.H. (1995). Drought and clipping effects on tiller demography and growth of two tussock grasses in Utah. *Journal of Arid Environments* **29**, 239.
- Busso, C.A., Mueller, R.J., and Richards, J.H. (1989). Effects of Drought and Defoliation on Bud Viability in Two Caespitose Grasses. *Ann Bot* **63**, 477-485.
- Casal, J., Sánchez, R.A. and Deregibus, V.A. (1986). The effect of plant density on tillering: the involvement of R/FR ratio and the proportion of radiation intercepted per plant. *Environmental and Experimental Botany* **26**, 365-371.
- Casal, J.J., Sanchez, R. A., Gibson, D. (1990). The Significance of Changes in the Red/Far-Red Ratio, Associated with Either Neighbour Plants or Twilight, for Tillering in *Lolium multiflorum* Lam. *New Phytologist* **116**, 565-572.
- Catterou, M., Dubois, F., Smets R, Vaniet, S., Kichey, T., Van Onckelen, H., Sangwan-Norreel, B., and Sangwan, R. (2002). hoc: An *Arabidopsis* mutant overproducing cytokinins and expressing high in vitro organogenic capacity. *Plant J.* **30**, 273-287.
- Cerdan, P.D., Yanovsky, M.J., Reymundo, F.C., Nagatani, A., Staneloni, R.J., Whitelam, G.C., and Casal, J.J. (1999). Regulation of phytochrome B signaling by phytochrome A and FHY1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **18**, 499-507.
- Chandler, J., Wilson, A., and Dean, C. (1996). *Arabidopsis* mutants showing an altered response to vernalization. *The Plant Journal* **10**, 637-644.
- Chatfield, S.P., Stirnberg, P., Forde, B.G., and Leyser, O. (2000). The hormonal regulation of axillary bud growth in *Arabidopsis*. *Plant J* **24**, 159-169.
- Chaudhury, A.M., Letham, S., Craig, S., and Dennis, E.S. (1993). amp1: A mutant with high cytokinin levels and altered embryonic pattern, faster vegetative growth, constitutive photomorphogenesis and precocious flowering. *Plant J.* **4**, 907-916.

- Chen, C.-M., Ertl, J.R., Leisner, S.M., and Chang, C.-C.** (1985). Localization of Cytokinin Biosynthetic Sites in Pea Plants and Carrot Roots. *Plant Physiol.* **78**, 510-513.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L., and Solano, R.** (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**, 666-671.
- Christensen, S.K., Dagenais, N., Chory, J. and Weigel, D.** (2000). Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID. *Cell* **100**, 469-478.
- Clark, R.M., Linton, E., Messing, J., and Doebley, J.F.** (2004). Inaugural Article: Pattern of diversity in the genomic region near the maize domestication gene *tb1*. *PNAS* **101**, 700-707.
- Clark, R.M., Wagler, T.N., Quijada, P., and Doebley, J.** (2006). A distant upstream enhancer at the maize domestication gene *tb1* has pleiotropic effects on plant and inflorescent architecture. *Nat Genet.* **38**, 594-597.
- Clifford, R., Lee, M.H., Nayak, S., Ohmachi, M., Giorgini, F., and Schedl, T.** (2000). FOG-2, a novel F-box containing protein, associates with the GLD-1 RNA binding protein and directs male sex determination in the *C. elegans* hermaphrodite germline. *Development* **127**, 5265-5276.
- Cline, M.G.** (1991). Apical Dominance. *Botanical Review* **57**, 318-358.
- Cline, M.G.** (1996). Exogenous auxin effects on lateral bud outgrowth in decapitated shoots. *Annals of Botany* **78**, 225-266.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-743.
- Crabbé, J.** (1994). Dormancy. (New York: Academic Press).
- Crowe, D.L.** (1993). Retinoic acid mediates post-transcriptional regulation of keratin 19 mRNA levels. *J Cell Sci* **106**, 183-188.
- Cubas, P., Lauter, N., Doebley, J., and Coen, E.** (1999). The TCP domain: a motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant J* **18**, 215-222.
- Cubas, P., Coen, E., and Zapater, J.** (2001). Ancient asymmetries in the evolution of flowers. *Curr Biol* **11**, 1050-1052.
- Cubas, P.** (2002). Role of TCP genes in the evolution of key morphological characters in Angiosperms. In *Developmental genetics and Plant Evolution*, Q. Cronk, Hawkins, J and Bateman, RM, ed (London: Taylor and Francis Ltd.), pp. 247-266.
- Dai, Y., Wang, H., Li, B., Huang, J., Liu, X., Zhou, Y., Mou, Z., and Li, J.** (2006). Increased Expression of MAP KINASE KINASE7 Causes Deficiency in Polar Auxin Transport and Leads to Plant Architectural Abnormality in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 308-320.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., Ehrismann, J., Jürgens, G., Estelle, M.** (2005). Plant Development Is Regulated by a Family of Auxin Receptor F Box Proteins. *Developmental Cell* **9**, 109-119.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F. Schell, J., van Montagu, M., Leemans, J.** (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* **13**, 4777-4788.
- Dejardin, J., Rappailles, A., Cuvier, O., Grimaud, C., Decoville, M., Locker, D., and Cavalli, G.** (2005). Recruitment of *Drosophila* Polycomb group proteins to chromatin by DSP1. *Nature* **434**, 533-538.
- Devlin, P.F., Robson, P.R.H., Patel, S.R., Goosey, L., Sharrock, R.A., and Whitelam, G.C.** (1999). Phytochrome D Acts in the Shade-Avoidance Syndrome in *Arabidopsis* by Controlling Elongation Growth and Flowering Time. *Plant Physiol.* **119**, 909-916.
- Doebley, J., Stec, A., and Gustus, C.** (1995). *teosinte branched1* and the origin of maize: evidence for epistasis and the evolution of dominance. *Genetics* **141**, 333-346.
- Doebley, J., Stec, A., and Hubbard, L.** (1997). The evolution of apical dominance in maize. *Nature* **386**, 485-488.
- Doerks, T., Copley, R., and Bork, P.** (2001). DDT - a novel domain in different transcription and chromosome remodeling factors. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 145-146.
- Dole, J.M., Wilkins, H.F.** (1999). *Plant growth regulation*. (Englewood, NJ: Prentice-Hall).
- Dorn, L.A., Hammond, E. and Schmidtt, J.** (2000). PLASTICITY TO LIGHT CUES AND RESOURCES IN *ARABIDOPSIS THALIANA*: TESTING FOR ADAPTIVE VALUE AND COSTS. *Evolution* **54**, 1982-1994.
- Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W.** (1988). High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16**, 6127-6145.
- Eneboe, E.J., Sowell, B.F, Heitschmidt, R.K., Karl, M.G., Aferkamp, M.R.** (2002). Drought and grazing: IV. Blue grama and western wheatgrass. *Journal of Range Management* **55**, 73-79.
- Englbrecht, C., Schoof, H., and Bohm, S.** (2004). Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the *Arabidopsis thaliana* genome. *BMC Genomics* **5**, 39.

- Evans, M.M., and Barton, M.K. (1997). Genetics Of Angiosperm Shoot Apical Meristem Development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 673-701.
- Evers, J.B., Vos, J.A.N., Andrieu, B., and Struik, P.C. (2006). Cessation of Tillering in Spring Wheat in Relation to Light Interception and Red: Far-red Ratio. *Ann Bot* **97**, 649-658.
- Fahlgren N, H.M., Kasschau KD, Chapman EJ, Sullivan CM, et al. (2007). High-Throughput Sequencing of Arabidopsis microRNAs: Evidence for Frequent Birth and Death of MIRNA Genes. *PLoS ONE* **2**, e219.
- Farkas, G., Gausz, J., Galloni, M., Reuter, G., Gyurkovics, H., and Karch, F. (2002). The Trithorax-like gene encodes the Drosophila GAGA factor. *Nature* **371**, 806-808.
- Feng, S., Ma, L., Wang, X., Xie, D., Dinesh-Kumar, S.P., Wei, N., and Deng, X.W. (2003). The COP9 Signalosome Interacts Physically with SCFCOI1 and Modulates Jasmonate Responses. *Plant Cell* **15**, 1083-1094.
- Feng, X., Zhao, Z., Tian, Z., Xu, S., Luo, Y., Cai, Z., Wang, Y., Yang, J., Wang, Z., Weng, L., Chen, J., Zheng, L., Guo, X., Luo, J., Sato, S., Tabata, S., Ma, W., Cao, X., Hu, X., Sun, C., and Luo, D. (2006). Control of petal shape and floral zygomorphy in *Lotus japonicus*. *PNAS* **103**, 4970-4975.
- Ferreira, F.J., and Kieber, J.J. (2005). Cytokinin signaling. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 518-525.
- Finlayson, S.A. (2007). Arabidopsis Teosinte Branched1-like 1 regulates axillary bud outgrowth and is homologous to monocot Teosinte Branched1. *Plant Cell Physiol* **48**, 667-677.
- Fitzgerald, H.A., Kasschau, K. D., Montgomery, T., Carrington, J. C. (2004). Developmental defects triggered by ectopic expression of microRNAs in Arabidopsis. In 14th International Conference on Arabidopsis Research (Berlin).
- Franklin, K.A., and Whitelam, G.C. (2005). Phytochromes and Shade-avoidance Responses in Plants. *Ann Bot* **96**, 169-175.
- Frewen, B.E., Chen, T.H.H., Howe, G.T., Davis, J., Rohde, A., Boerjan, W., and Bradshaw, H.D., Jr. (2000). Quantitative Trait Loci and Candidate Gene Mapping of Bud Set and Bud Flush in *Populus*. *Genetics* **154**, 837-845.
- Friml, J., Yang, X., Michniewicz, M., Weijers, D., Quint, A., Tietz, O., Benjamins, R., Ouwerkerk, P.B.F., Ljung, K., Sandberg, G., Hooykaas, P.J.J., Palme, K., and Offringa, R. (2004). A PINOID-Dependent Binary Switch in Apical-Basal PIN Polar Targeting Directs Auxin Efflux. *Science* **306**, 862-865.
- Gagne, J.M., Downes, B.P., Shiu, S.-H., Durski, A.M., and Vierstra, R.D. (2002). The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *PNAS* **99**, 11519-11524.
- Gallavotti, A., Zhao, Q., Kyojuka, J., Meeley, R.B., Ritter, M.K., Doebley, J.F., Pe, M.E., and Schmidt, R.J. (2004). The role of barren stalk1 in the architecture of maize. *Nature* **432**, 630-635.
- Gällweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., and Palme, K. (1998). Regulation of Polar Auxin Transport by ATPIN1 in Arabidopsis Vascular Tissue. *Science* **282**, 2226-2230.
- Garrison, R. (1955). Studies in the development of axillary buds. *Am. J. Bot.* **42**, 257-266.
- Gautier, H., Varlet-Grancher, C., and Hazard, L. (1999). Tillering Responses to the Light Environment and to Defoliation in Populations of Perennial Ryegrass (*Lolium perenne*L.) Selected for Contrasting Leaf Length. *Ann Bot* **83**, 423-429.
- Gendall, A.R., Levy, Y.Y., Wilson, A., and Dean, C. (2001). The VERNALIZATION 2 Gene Mediates the Epigenetic Regulation of Vernalization in Arabidopsis. *Cell* **107**, 525-535.
- Gil-Albert Velarde, F. (1998). Tratado de Arboricultura frutal (Vol. II): la ecología del árbol frutal. (Mundi-Prensa Libros, S.A.).
- Gocal, G. F., Pharis, R. P., Yeung, E. C., Pearce, D. (1991). Changes after Decapitation in Concentrations of Indole-3-Acetic Acid and Absciscic Acid in the Larger Axillary Bud of *Phaseolus vulgaris* L. cv Tender Green. *Plant Physiol* **95**(2): 344-350.
- Goto, Y., Tanabe, M., Ishibashi, T., Tsutsumi, N., Yoshimura, A., Nemoto, K. (2005). Tillering behavior of the rice *fine culm 1* mutant. *Plant Prod. Sci.* **8**, 68-70.
- Graaff, E., Boot, K., Granbom, R., Sandberg, G., Hooykaas, P.J. J. (2003). Increased Endogenous Auxin Production in Arabidopsis thaliana Causes Both Earlier Described and Novel Auxin-Related Phenotypes. *Journal of Plant Growth Regulation* **22**, 240 - 252.
- Greb, T., Clarenz, O., Schafer, E., Muller, D., Herrero, R., Schmitz, G., and Theres, K. (2003). Molecular analysis of the LATERAL SUPPRESSOR gene in Arabidopsis reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *Genes Dev* **17**, 1175-1187.
- Guilfoyle, T.J., Ulmasov, T., Hagen, G. (1998). The ARF family of transcription factors and their role in plant hormone-responsive transcription. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**, 619-627.
- Guo, Y., and Gan, S. (2007). *ATMYB2* regulates whole plant senescence by suppressing cytokinin anabolism. In 19th Annual Meeting International Plant Growth Substances Association (Puerto Vayarta, México).
- Gutierrez, R.A., MacIntosh, G.C., and Green, P.J. (1999). Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control. *Trends in Plant Science* **4**, 429-438.

- Hagen, G., and Guilfoyle, T. (2002). Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol* **49**, 373-385.
- Halbach, T., Scheer, N., and Werr, W. (2000). Transcriptional activation by the PHD finger is inhibited through an adjacent leucine zipper that binds 14-3-3 proteins. *Nucl. Acids Res.* **28**, 3542-3550.
- Halliday, K.J., Koornneef, M., and Whitelam, G.C. (1994). Phytochrome B and at Least One Other Phytochrome Mediate the Accelerated Flowering Response of *Arabidopsis thaliana* L. to Low Red/Far-Red Ratio. *Plant Physiol* **104**, 1311-1315.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557-580.
- Hansen, C.H., Wittstock, U., Olsen, C.E., Hick, A.J., Pickett, J.A., and Halkier, B.A. (2001). Cytochrome P450 CYP79F1 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of dihomomethionine and trihomomethionine to the corresponding aldoximes in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates. *J. Biol. Chem.*, M010123200.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816.
- Hayashi, T., Heins, R.D., Cameron, A.C., Carlson, W.H. (2001). Ethephon influences flowering, height, and branching of several herbaceous perennials. *Scientia Horticulturae* **91**, 305-323.
- Heim, R., Prasher, D.C., and Tsien, R.Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 12501-12504.
- Helliwell, C., Chin-Atkins, A., Wilson, I., Chapple, R., Dennis, E., and Chaudhury, A. (2001). The *Arabidopsis* AMP1 Gene Encodes a Putative Glutamate Carboxypeptidase. *Plant Cell* **13**, 2115-2126.
- Hensel, L.L., Nelson, M.A., Richmond, T.A., and Bleecker, A.B. (1994). The Fate of Inflorescence Meristems Is Controlled by Developing Fruits in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **106**, 863-876.
- Hibara, K.-i., Karim, M.R., Takada, S., Taoka, K.-i., Furutani, M., Aida, M., and Tasaka, M. (2006). *Arabidopsis* CUP-SHAPED COTYLEDON3 Regulates Postembryonic Shoot Meristem and Organ Boundary Formation. *Plant Cell* **18**, 2946-2957.
- Hillman, J.R., Math, V.B., and Medlow, G.C. (1977). Apical dominance and the levels of indole acetic acid in *Phaseolus lateral* buds. *Planta* **134**, 191-193.
- Höfgen, R., Willmitzer, L. (1988). Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Research* **16**, 9977.
- Hosokawa, Z., Shi, L., Prasad, T.K., and Cline, M.G. (1990). Apical Dominance Control in *Ipomoea nil*: The Influence of the Shoot Apex, Leaves and Stem. *Ann Bot* **65**, 547-556.
- Hu, W., Zhang, S., Zhao, Z., Sun C, Zhao, Y., and Luo, D. (2003). The Analysis of the Structure and Expression of OsTB1 Gene in Rice. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* **29**, 507-514.
- Hubbard, L., McSteen, P., Doebley, J., and Hake, S. (2002). Expression Patterns and Mutant Phenotype of teosinte branched1 Correlate With Growth Suppression in Maize and Teosinte. *Genetics* **162**, 1927-1935.
- Ishikawa, S., Maekawa, M., Arite, T., Onishi, K., Takamure, I., and Kyojuka, J. (2005). Suppression of Tiller Bud Activity in Tillering Dwarf Mutants of Rice. *Plant Cell Physiol.* **46**, 79-86.
- Ito, T., Sakai, H., and Meyerowitz, E.M. (2003). Whorl-specific expression of the SUPERMAN gene of *Arabidopsis* is mediated by cis elements in the transcribed region. *Curr Biol* **13**, 1524-1530.
- Jablanovic, M., Neskovic, M. (1977). Changes in endogenous level of auxins and cytokinins in axillary buds of *Pisum sativum* L in relation to apical dominance. *Biol Plant* **19**, 34-39.
- Jacobs, W.P. and Case, D.B. (1965). Auxin Transport, Gibberellin, and Apical Dominance. *Science* **148**, 1729 - 1731.
- Jaillon, O., Aury, J.-M., Noel, B., et al., (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **449**, 463-468.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Droge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., and Parcy, F. (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* **7**, 106-111.
- James, P., Halladay, J., and Craig, E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436.
- Jiao, X.Y., Yang, Z.P., Zhao, R. F., Wang, L. Z. (2007). Effects of boron on indole-3-acetic acid transportation in intact *Phaseolus aureus* plant. *Chinese Journal of Applied Ecology* **18**, 366-370.
- Johnson, X., Bricch, T., Dun, E.A., Goussot, M., Haurogne, K., Beveridge, C.A., and Rameau, C. (2006). Branching Genes Are Conserved across Species. Genes Controlling a Novel Signal in Pea Are Coregulated by Other Long-Distance Signals. *Plant Physiol.* **142**, 1014-1026.
- Kalinina, A., Mihajlovic, N., and Grbic, V. (2002). Axillary meristem development in the branchless *Zu-0* ecotype of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **215**, 699-707.
- Kang, J.Y., Choi, H.I., Im, M.Y., and Kim, S.Y. (2002). *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell* **14**, 343-357.

- Katz, A., Oliva, M., Mosquana, A., Hakim, O., and Ohad, N. (2004). FIE and CURLY LEAF polycomb proteins interact in the regulation of homeobox gene expression during sporophyte development. *The Plant Journal* **37**, 707-719.
- Kebrom, T.H., Burson, B.L., and Finlayson, S.A. (2006). Phytochrome B Represses Teosinte Branched1 Expression and Induces Sorghum Axillary Bud Outgrowth in Response to Light Signals. *Plant Physiol* **140**, 1109-1117.
- Kebrom, T.H., and Brutnell, T.P. (2007). The molecular analysis of the shade avoidance syndrome in the grasses has begun. *J Exp Bot*.
- Keller, T., Abbott, J., Moritz, T., and Doerner, P. (2006). Arabidopsis REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS1 controls a leaf axil stem cell niche and modulates vegetative development. *Plant Cell* **18**, 598-611.
- Kiba, T., Naitou, T., Koizumi, N., Yamashino, T., Sakakibara, H., and Mizuno, T. (2005). Combinatorial Microarray Analysis Revealing Arabidopsis Genes Implicated in Cytokinin Responses through the His->Asp Phosphorelay Circuitry. *Plant Cell Physiol* **46**, 339-355.
- Kim, J., Harter, K., and Theologis, A. (1997). Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 11786-11791.
- King, R.A., Van Staden, J. (1988). Differential responses of buds along the shoot of *Pisum sativum* to isopentyladenine and zeatin application. *Plant Physiol Biochem* **26**, 253-259.
- Kipreos, E., and Pagano, M. (2000). The F-box protein family. *Genome Biology* **1**, reviews3002.3001 - reviews3002.3007.
- Kohler, C., Hennig, L., Spillane, C., Pien, S., Gruissem, W., and Grossniklaus, U. (2003). The Polycomb-group protein MEDEA regulates seed development by controlling expression of the MADS-box gene PHERES1. *Genes Dev.* **17**, 1540-1553.
- Komatsu, K., Maekawa, M., Ujiie, S., Satake, Y., Furutani, I., Okamoto, H., Shimamoto, K., and Kyozuka, J. (2003). LAX and SPA: Major regulators of shoot branching in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100**, 11765-11770
- Kooiker, M., Airoidi, C.A., Losa, A., Manzotti, P.S., Finzi, L., Kater, M.M., and Colombo, L. (2005). BASIC PENTACYSTEINE1, a GA binding protein that induces conformational changes in the regulatory region of the homeotic Arabidopsis gene SEEDSTICK. *Plant Cell* **17**, 722-729.
- Kosugi, S., and Ohashi, Y. (1997). PCF1 and PCF2 specifically bind to cis elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene. *Plant Cell* **9**, 1607-1619.
- Kosugi, S., and Ohashi, Y. (2002). DNA binding and dimerization specificity and potential targets for the TCP protein family. *Plant J* **30**, 337-348.
- Koyama, T., Furutani, M., Tasaka, M., and Ohme-Takagi, M. (2007). TCP transcription factors control the morphology of shoot lateral organs via negative regulation of the expression of boundary-specific genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 473-484.
- Ku, H.-M., Vision, T., Liu, J., and Tanksley, S.D. (2000). Comparing sequenced segments of the tomato and Arabidopsis genomes: Large-scale duplication followed by selective gene loss creates a network of synteny. *PNAS* **97**, 9121-9126.
- Kuraparthi, V., Sood, S., Dhaliwal, H., Chhuneja, P., Gill, B. (2007). Identification and mapping of a tiller inhibition gene (tin3) in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **114**, 285 - 294.
- Lakiza, O., Frater, L., Yoo, Y., Villavicencio, E., Walterhouse, D., Goodwin, E.B., and Iannaccone, P. (2005). STAR proteins quaking-6 and GLD-1 regulate translation of the homologues GLI1 and tra-1 through a conserved RNA 3'UTR-based mechanism. *Developmental Biology* **287**, 98-110.
- Laroia, G., and Schneider, R.J. (2002). Alternate exon insertion controls selective ubiquitination and degradation of different AUF1 protein isoforms. *Nucl. Acids Res.* **30**, 3052-3058.
- Laroia, G., Sarkar, B., and Schneider, R.J. (2002). Ubiquitin-dependent mechanism regulates rapid turnover of AU-rich cytokine mRNAs. *PNAS* **99**, 1842-1846.
- Laroia, G., Cuesta, R., Brewer, G., and Schneider, R.J. (1999). Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science* **284**, 499-502.
- Lazo G.R., Stein, P.A., Ludwig R.A. (1991). A DNA transformation-competent Arabidopsis genomic library in *Agrobacterium*. *Bio/Technology* **9**, 963-967.
- Leibovitch, B.A., Quinn, L., Benjamin, L.R., Yingyun, L., Gilmour, D.S., Elgin, S.C.R. (2002). GAGA factor and the TFIID complex collaborate in generating an open chromatin structure at the *Drosophila melanogaster* hsp26 promoter. *Molecular and cellular biology* **17**, 6148-6157.
- Lennox, E.S. (1955). Transduction of Linked Genetic Characters of the host by bacteriophage P1. *Virology* **1**, 190.
- Leyser, H.M., Lincoln, C.A., Timppte, C., Lammer, D., Turner, J., and Estelle, M. (1993). Arabidopsis auxin-resistance gene AXR1 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature* **364**, 161-164.

- Li, C., Potuschak, T., Colon-Carmona, A., Gutierrez, R.A., and Doerner, P. (2005). Arabidopsis TCP20 links regulation of growth and cell division control pathways PNAS **102**, 12978-12983.
- Li, X., Qian, Q., Fu, Z., Wang, Y., Xiong, G., Zeng, D., Wang, X., Liu, X., Teng, S., Hiroshi, F., Yuan, M., Luo, D., Han, B., and Li, J. (2003). Control of tillering in rice. Nature **422**, 618-621.
- Liljegren, S.J., Roeder, A.H., Kempin, S.A., Gremski, K., Ostergaard, L., Guimil, S., Reyes, D.K., and Yanofsky, M.F. (2004). Control of fruit patterning in Arabidopsis by INDEHISCENT. Cell **116**, 843-853.
- Liu, Z.B., Ulmasov, T., Shi, X., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1994). Soybean GH3 Promoter Contains Multiple Auxin-Inducible Elements. Plant Cell **6**, 645-657.
- Ljung, K., Bhalerao, R.P., and Sandberg, G. (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. The Plant Journal **28**, 465-474.
- Long, J., and Barton, M.K. (2000). Initiation of axillary and floral meristems in Arabidopsis. Dev Biol **218**, 341-353.
- Lukens, L., and Doebley, J. (1999). Epistatic and environmental interactions for quantitative trait loci involved in maize evolution. Genetical Research **74**, 291-302.
- Luo, D., Carpenter, R., Vincent, C., Copsey, L., and Coen, E. (1996). Origin of floral asymmetry in Antirrhinum. Nature **383**, 794-799.
- Luo, D., Carpenter, R., Copsey, L., Vincent, C., Clark, J., and Coen, E. (1999). Control of organ asymmetry in flowers of Antirrhinum. Cell **99**, 367-376.
- Llave, C., Kasschau, K.D., and Carrington, J.C. (2000). Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. PNAS **97**, 13401-13406.
- Madzima, T., Kaufman, L., Folta, K.M. (2007). KFR1, A novel Kelch-domain, F-box protein regulates ubiquitination-dependent transcript stability. In Botany & Plant Biology (Chicago, Illinois).
- Mandaokar, A., Thines, B., Shin, B., Markus Lange, B., Choi, G., Koo, Y.J., Yoo, Y.J., Choi, Y.D., Choi, G., and Browse, J. (2006). Transcriptional regulators of stamen development in Arabidopsis identified by transcriptional profiling. The Plant Journal **46**, 984-1008.
- Mapelli, S., and Rocchi, P. (1985). Endogenous Absciscic Acid in torosa-2 Mutant Tomato Plant. Plant Cell Physiol. **26**, 371-374.
- Mapelli, S., and Kinet, J.M. (1992). Plant growth regulator and graft control of axillary bud formation and development in the TO-2 mutant tomato. Plant Growth Regulation **11**, 385-390.
- Marschner, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. (London: Academic Press).
- McConnell, J.R., and Barton, M.K. (1998). Leaf polarity and meristem formation in Arabidopsis. Development **125**, 2935-2942.
- McConnell, J.R., Barton M. K. (1995). Effect of mutations in the PINHEAD gene of Arabidopsis on the formation of shoot apical meristems. Developmental Genetics **16**, 358-366.
- McCormick, S., Niedermeyer, J., Fry, J., Barnason, A., Horsch, R., and Fraley, R. (1986). Leaf Disk Transformation Of Cultivated Tomato (Lycopersicon-Esulentum) Using Agrobacterium-Tumefaciens. Plant Cell Reports **5**, 81-84.
- McIntyre, G.I. (1987). The role of water in the regulation of plant development. Can J Bot **65**, 1287-1298.
- McIntyre, G.I., Cessna, A. J. (1991). Apical dominance in *Phaseolus vulgaris*: effect of the nitrogen supply. Can J Bot **69**, 1337-1343.
- McSteen, P., and Leyser, O. (2005). SHOOT BRANCHING. Annual Review of Plant Biology **56**, 353-374.
- McSteen, P., Malcomber, S., Skirpan, A., Lunde, C., Wu, X., Kellogg, E., and Hake, S. (2007). barren inflorescence2 Encodes a Co-Ortholog of the PINOID Serine/Threonine Kinase and Is Required for Organogenesis during Inflorescence and Vegetative Development in Maize. Plant Physiol. **144**, 1000-1011.
- Médiène, S., Pagès, L., Jordan, M., Le Bot, J., Adamowicz, S. (2002). Influence of nitrogen availability on shoot development in young peach trees [Prunus persica (L.) Batsch]. Trees - Structure and Function **16**, 547-554.
- Meister, R.J., Williams, L.A., Monfared, M.M., Gallagher, T.L., Kraft, E.A., Nelson, C.G., and Gasser, C.S. (2004). Definition and interactions of a positive regulatory element of the Arabidopsis INNER NO OUTER promoter. The Plant Journal **37**, 426-438.
- Mersereau, M., Pazour, G.J., and Das, A. (1990). Efficient transformation of Agrobacterium tumefaciens by electroporation. Gene **90**, 149.
- Miguel, L., Longnecker, N., Ma, W., Osborne, L., and Atkins, C. (1998). Branch development in Lupinus angustifolius L.#1. Not all branches have the same potential growth rate. J. Exp. Bot. **49**, 547-553.
- Morris, D.A., and Johnson, C.F. (1990). The role of auxin efflux carriers in the reversible loss of polar auxin transport in the pea (Pisum sativum L.) stem. Planta **181**, 117 -124.
- Morris, S.E., Turnbull, C.G.N., Murfet, I.C., and Beveridge, C.A. (2001). Mutational Analysis of Branching in Pea. Evidence That Rms1 and Rms5 Regulate the Same Novel Signal. Plant Physiol. **126**, 1205-1213.



- Morris, S.E., Cox, M.C.H., Ross, J.J., Krisantini, S., and Beveridge, C.A. (2005). Auxin Dynamics after Decapitation Are Not Correlated with the Initial Growth of Axillary Buds. *Plant Physiol.* **138**, 1665-1672.
- Muller, D., Schmitz, G., and Theres, K. (2006). Blind homologous R2R3 Myb genes control the pattern of lateral meristem initiation in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 586-597.
- Nair, A.K., Kash, J.C., Peegel, H., and Menon, K.M.J. (2002). Post-transcriptional Regulation of Luteinizing Hormone Receptor mRNA in the Ovary by a Novel mRNA-binding Protein. *J. Biol. Chem.* **277**, 21468-21473.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T. and Kimura, T. (2007). Development of Series of Gateway Binary Vectors, pGWBs, for Realizing Efficient Construction of Fusion Genes for Plant Transformation. *Journal of Biosciences and Bioengineering* **104**, 34-41.
- Nakamura, A., Higuchi, K., Goda, H., Fujiwara, M.T., Sawa, S., Koshiba, T., Shimada, Y., and Yoshida, S. (2003). Brassinolide Induces IAA5, IAA19, and DR5, a Synthetic Auxin Response Element in Arabidopsis, Implying a Cross Talk Point of Brassinosteroid and Auxin Signaling. *Plant Physiol.* **133**, 1843-1853.
- Nakamoto, D., Ikeura, A., Asami, T., and Yamamoto, K.T. (2006). Inhibition of brassinosteroid biosynthesis by either a dwarf4 mutation or a brassinosteroid biosynthesis inhibitor rescues defects in tropic responses of hypocotyls in the arabidopsis mutant nonphototropic hypocotyl 4. *Plant Physiol* **141**, 456-464.
- Naoki, F., Tatsuru, M., Hirofumi, K., Hiroshi, S., Hiroyuki, O., Ken-ichiro, T. (2005). Identification of a Novel Cis-Element Exhibiting Cytokinin-Dependent Protein Binding in Vitro in the 5'-region of NADPH-Protochlorophyllide Oxidoreductase Gene in Cucumber. *Plant Molecular Biology* **59**, 631 - 645.
- Napoli, C.A., Beveridge, C.A., and Snowden, K.C. (1999). Reevaluating concepts of apical dominance and the control of axillary bud outgrowth. *Curr Top Dev Biol* **44**, 127-169.
- Nath, U., Crawford, B., Carpenter, R., and Coen, E. (2003). Genetic control of surface curvature. *Science* **299**, 1404-1407.
- Neff, M.M., and Chory, J. (1998). Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B, and cryptochrome 1 during Arabidopsis development. *Plant Physiol* **118**, 27-35.
- Nemhauser, J.L., Mockler, T.C. and Chory, J. (2004). Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in Arabidopsis. *PLoS Biol.* **2**, p. E258.
- Nogué, N., Hocart, H., Letham, D. S., Dennis, E. S., Chaudhury, A. M. (2000). Cytokinin synthesis is higher in the Arabidopsis amp1 mutant. *Plant Growth Regulation* **32**, 267-273.
- Nordstrom, A., Tarkowski, P., Tarkowska, D., Norbaek, R., Astot, C., Dolezal, K., and Sandberg, G. (2004). Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in Arabidopsis thaliana: A factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *PNAS* **101**, 8039-8044.
- O'Kane, S.L. Jr. and Al-Shehbaz, I. A. (2003). Phylogenetic position and generic limits of Arabidopsis (Brassicaceae) based on sequences of nuclear ribosomal DNA. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **90**, 603-612.
- Okoloko, G.E. and Lewis, L.N. (1968). Enhancement of lateral bud growth in *Coleus blumei* BENTH. by (2-chloroethyl) trimethylammonium chloride (CCC). *Plant and Cell Physiology* **9**, 259-266.
- Okushima, Y., Overvoorde, P.J., Arima, K., Alonso, J.M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J.R., Hughes, B., Lui, A., Nguyen, D., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G., and Theologis, A. (2005). Functional Genomic Analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR Gene Family Members in Arabidopsis thaliana: Unique and Overlapping Functions of ARF7 and ARF19. *Plant Cell* **17**, 444-463.
- Ori, N., Cohen, A.R., Etzioni, A., Brand, A., Yanai, O., Shleizer, S., Menda, N., Amsellem, Z., Efroni, I., Pekker, I., Alvarez, J.P., Blum, E., Zamir, D. and Eshed, Y. (2007). Regulation of LANCEOLATE by miR319 is required for compound-leaf development in tomato. *Nature Genetics* **39**, 787-791.
- Osborne, D.J. (1967). Hormonal regulation of leaf senescence. (New York: Academic Press).
- Otsuga, D., DeGuzman, B., Prigge, M.J., Drews, G.N., and Clark, S.E. (2001). REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions. *Plant J* **25**, 223-236.
- Pääbo, S. (1999). Agriculture: Neolithic genetic engineering. *Nature* **398**, 194-195.
- Palatnik, J., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J., and Weigel, D. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* **425**, 257-263.
- Parcy, F., and Nilsson, O. (1998). A genetic framework for floral patterning. *Nature* **395**, 561-566.
- Park, H.C., Kim, M.L., Kang, Y.H., Jeon, J.M., Yoo, J.H., Kim, M.C., Park, C.Y., Jeong, J.C., Moon, B.C., Lee, J.H., Yoon, H.W., Lee, S.-H., Chung, W.S., Lim, C.O., Lee, S.Y., Hong, J.C., and Cho, M.J. (2004). Pathogen- and NaCl-Induced Expression of the SCaM-4 Promoter Is Mediated in Part by a GT-1 Box That Interacts with a GT-1-Like Transcription Factor. *Plant Physiol.* **135**, 2150-2161.
- Pauli, S., Rothnie, H.M., Chen, G., He, X., and Hohn, T. (2004). The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter Extends into the Transcribed Region. *J. Virol.* **78**, 12120-12128.

- Pei, Z.-M., Ghassemian, M., Kwak, C.M., McCourt, P., and Schroeder, J.I. (1998). Role of Farnesyltransferase in ABA Regulation of Guard Cell Anion Channels and Plant Water Loss. *Science* **282**, 287-290.
- Peng, M., Cui, Y., Bi, Y.-M., and Rothstein, S.J. (2006). AtMBD9: a protein with a methyl-CpG-binding domain regulates flowering time and shoot branching in Arabidopsis. *The Plant Journal* **46**, 282-296.
- Phillips, I.D.J. (1969). Auxin-gibberellin interaction in apical dominance: Experiments with tall and dwarf varieties of pea and bean. *Planta* **86**, 315-323.
- Piechulla, B., Merforth, N., Rudolph, B. (1998). Identification of tomato Lhc promoter regions necessary for circadian expression. *Plant Molecular Biology* **38**, 655-662.
- Piippo, S., Huhta, A.-P., Rautio, P., and Tuomi, J. (2005). Resource availability at the rosette stage and apical dominance in the strictly biennial *Erysimum strictum* (Brassicaceae). *Canadian Journal of Botany* **83**, 405-412.
- Pogson, B., McDonald, K.A., Truong, M., Britton, G., and DellaPenna, D. (1996). Arabidopsis carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants. *Plant Cell* **8**, 1627-1639.
- Prasad, T.K., Li, X., Abdel-Rahman, A.M., Hosokawa, Z., Cloud, N.P., Lamotte, C.E., and Cline, M.G. (1993). Does Auxin Play a Role in the Release of Apical Dominance by Shoot Inversion in *Ipomoea nil*? *Ann Bot* **71**, 223-229.
- Prasad, V., Stromberg, C.A.E., Alimohammadian, H., and Sahni, A. (2005). Dinosaur Coprolites and the Early Evolution of Grasses and Grazers. *Science* **310**, 1177-1180.
- Przemeck, G.K., Mattsson, J., Hardtke, C.S., Sung, Z.R., and Berleth, T. (1996). Studies on the role of the Arabidopsis gene MONOPTEROS in vascular development and plant cell axialization. *Planta* **200**, 229-237.
- Qin, L.J., Guo, X.Z., Feng, X.Z., Weng, L., Yan, J., Hu, X.H., and Luo, D. (2004). Cloning of LjCYC1 gene and nuclear localization of LjCYC1 protein in *Lotus japonicus*. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao* **30**, 523-532.
- Quint, M., and Gray, W.M. (2006). Auxin signaling. *Curr Opin Plant Biol* **9**, 448-453.
- Reintanz, B., Lehnen, M., Reichelt, M., Gershenzon, J., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Godde, M., Uhl, R., and Palme, K. (2001). bus, a Bushy Arabidopsis CYP79F1 Knockout Mutant with Abolished Synthesis of Short-Chain Aliphatic Glucosinolates. *Plant Cell* **13**, 351-367.
- Remigereau, M.-S., Langin, T., Gale, M.D., Devos, K.M., Sarr, A. and Robert, T. (2005). Comparative genetics of domestication: roles of Tb1 orthologs in the architecture of pearl millet and other grasses. (no publicado).
- Reta-Sanchez, D.G., and Fowler, J.L. (2002). Canopy Light Environment and Yield of Narrow-Row Cotton as Affected by Canopy Architecture. *Agron J* **94**, 1317-1323.
- Risseuw, E.P., Daskalchuk, T.E., Banks, T.W., Liu, E., Cotelesage, J., Hellmann, H., Estelle, M., Somers, D.E., and Crosby, W.L. (2003). Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from Arabidopsis. *Plant J* **34**, 753-767.
- Rogg, L.E., Lasswell, J., and Bartel, B. (2001). A Gain-of-Function Mutation in IAA28 Suppresses Lateral Root Development. *Plant Cell* **13**, 465-480.
- Rohde, A., Prinsen, E., De Rycke, R., Engler, G., Van Montagu, M., and Boerjan, W. (2002). PtABI3 Impinges on the Growth and Differentiation of Embryonic Leaves during Bud Set in Poplar. *Plant Cell* **14**, 1885-1901.
- Romano, C.P., Cooper, M.L., and Klee, H.J. (1993). Uncoupling Auxin and Ethylene Effects in Transgenic Tobacco and Arabidopsis Plants. *Plant Cell* **5**, 181-189.
- Romero, I., Fuertes, A., Benito, M.J., Malpica, J.M., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (1998). More than 80R2R3-MYB regulatory genes in the genome of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **14**, 273-284.
- Ross, E.J.H., Stone, J.M., Elowsky, C.G., Arredondo-Peter, R., Klucas, R.V., and Sarath, G. (2004). Activation of the Oryza sativa non-symbiotic haemoglobin-2 promoter by the cytokinin-regulated transcription factor, ARR1. *J. Exp. Bot.* **55**, 1721-1731.
- Ross, J.J., Reid, J.B., Bishop, G. J., Eloise, F. (2007). Opposing effects of brassinosteroids and gibberellins on shoot branching. In 19th Annual Meeting International Plant Growth Substances Association (Puerto Vayarta, México).
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., and Weisshaar, B. (2003). An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol* **53**, 247-259.
- Royo, J., Leon, J., Vancanneyt, G., Albar, J.P., Rosahl, S., Ortego, F., Castanera, P., and Sanchez-Serrano, J.J. (1999). Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. *PNAS* **96**, 1146-1151.

- Ruegger, M., Dewey, E., Gray, W.M., Hobbie, L., Turner, J., and Estelle, M. (1998). The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes Dev.* **12**, 198-207.
- Sachs, T., Thimann, K.V. (1967). The role of auxins and cytokinins in the release of buds from dominance. *Am J Bot* **54**, 136-144.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor, N.Y.).
- Sangwan, I., and O'Brian, M.R. (2002). Identification of a Soybean Protein That Interacts with GAGA Element Dinucleotide Repeat DNA. *Plant Physiol.* **129**, 1788-1794.
- SanMiguel, P., Tikhonov, A., Jin, Y.-K., Motchoulskaia, N., Zakharov, D., Melake-Berhan, A., Springer, P.S., Edwards, K.J., Lee, M., Avramova, Z., and Bennetzen, J.L. (1996). Nested Retrotransposons in the Intergenic Regions of the Maize Genome. *Science* **274**, 765-768.
- Santi, L., Wang, Y., Stile, M.R., Berendzen, K., Wanke, D., Roig, C., Pozzi, C., Muller, K., Muller, J., Rohde, W., and Salamini, F. (2003). The GA octodinucleotide repeat binding factor BBR participates in the transcriptional regulation of the homeobox gene Bkn3. *The Plant Journal* **34**, 813-826.
- Sarnowski, T.J., Swiezewski, S., Pawlikowska, K., Kaczanowski, S., and Jerzmanowski, A. (2002). AtSWI3B, an Arabidopsis homolog of SWI3, a core subunit of yeast Swi/Snf chromatin remodeling complex, interacts with FCA, a regulator of flowering time. *Nucleic Acids Res* **30**, 3412-3421.
- Sarnowski, T.J., Rios, G., Jasik, J., Swiezewski, S., Kaczanowski, S., Li, Y., Kwiatkowska, A., Pawlikowska, K., Kozbial, M., Kozbial, P., Koncz, C., and Jerzmanowski, A. (2005). SWI3 subunits of putative SWI/SNF chromatin-remodeling complexes play distinct roles during Arabidopsis development. *Plant Cell* **17**, 2454-2472.
- Schmitz, G., and Theres, K. (2005). Shoot and inflorescence branching. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 506-511.
- Schmitz, G., Tillmann, E., Carriero, F., Fiore, C., Cellini, F., and Theres, K. (2002). The tomato Blind gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation of lateral meristems. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 1064-1069.
- Schonrock, N., Bouveret, R., Leroy, O., Borghi, L., Kohler, C., Gruissem, W., and Hennig, L. (2006). Polycomb-group proteins repress the floral activator AGL19 in the FLC-independent vernalization pathway. *Genes Dev.* **20**, 1667-1678.
- Schrader, J., Moyle, R., Bhalerao, R., Hertzberg, M., Lundeberg, J., Nilsson, P., and Bhalerao, R.P. (2004). Cambial meristem dormancy in trees involves extensive remodelling of the transcriptome. *The Plant Journal* **40**, 173-187.
- Schumacher, K., Schmitt, T., Rossberg, M., Schmitz, G., and Theres, K. (1999). The Lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 290-295.
- Schwab, R., Palatnik, J.F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M., and Weigel, D. (2005). Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev Cell* **8**, 517-527.
- Schwartz, S.H., Qin, X., and Loewen, M.C. (2004). The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from Arabidopsis indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *J Biol Chem* **279**, 46940-46945.
- Scott, J.W., Harbaugh, B.K. (1989). MicroTom - a miniature dwarf tomato. *Fla Agr Exp Sta Circ* **370**, 1-6.
- Scott, T.K., Case, D.B., Jacobs, W.P. (1967). Auxin-Gibberellin Interaction in Apical Dominance. *Plant Physiology* **42**, 1329-1333.
- Sessions, A., Weigel, D., and Yanofsky, M.F. (1999). The Arabidopsis thaliana MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *Plant J* **20**, 259-263.
- Sheldon, C.C., Conn, A.B., Dennis, E.S., and Peacock, W.J. (2002). Different Regulatory Regions Are Required for the Vernalization-Induced Repression of FLOWERING LOCUS C and for the Epigenetic Maintenance of Repression. *Plant Cell* **14**, 2527-2537.
- Shimizu-Sato, S., and Mori, H. (2001). Control of Outgrowth and Dormancy in Axillary Buds. *Plant Physiol.* **127**, 1405-1413.
- Shin, B., Choi, G., Yi, H., Yang, S., Cho, I., Kim, J., Lee, S., Paek, N.C., Kim, J.H., Song, P.S., and Choi, G. (2002). AtMYB21, a gene encoding a flower-specific transcription factor, is regulated by COP1. *Plant J* **30**, 23-32.
- Shin, R., Burch, A.Y., Huppert, K.A., Tiwari, S.B., Murphy, A.S., Guilfoyle, T.J., and Schachtman, D.P. (2007). The Arabidopsis Transcription Factor MYB77 Modulates Auxin Signal Transduction. *Plant Cell*, tpc.107.050963.
- Shuai, B., Reynaga-Pena, C.G., and Springer, P.S. (2002). The Lateral Organ Boundaries Gene Defines a Novel, Plant-Specific Gene Family. *Plant Physiol.* **129**, 747-761.
- Sieburth, L.E., and Meyerowitz, E.M. (1997). Molecular Dissection of the AGAMOUS Control Region Shows That cis Elements for Spatial Regulation Are Located Intragenically. *Plant Cell* **9**, 355-365.

- Sitbon, F., Hennion, S., Sundberg, B., Little, C.H.A., Olsson, O., and Sandberg, G. (1992). Transgenic Tobacco Plants Coexpressing the *Agrobacterium tumefaciens* *iaaM* and *iaaH* Genes Display Altered Growth and Indoleacetic Acid Metabolism. *Plant Physiol.* **99**, 1062-1069.
- Sitte P, Z.H., Ehrendorfer F, Bresinsky A. (1994). Strasburger. Tratado de Botánica. (Barcelona.: Ediciones Omega, S.A.).
- Skalova, H., Krahulec, F. (1992). The Response of Three *Festuca rubra* Clones to Changes in Light Quality and Plant Density. *Functional Ecology* **6**, 282-290.
- Skirycz, A., Jozefczuk, S., Stobiecki, M., Muth, D., Zanon, M.I., Witt, I., and Mueller-Roeber, B. (2007). Transcription factor AtDOF4/2 affects phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **175**, 425-438.
- Skirycz, A., Reichelt, M., Burrow, M., Birkemeyer, C., Rolcik, J., Kopka, J., Zanon, M.I., Gershenzon, J., Strnad, M., Szopa, J., Mueller-Roeber, B., and Witt, I. (2006). DOF transcription factor AtDof1.1 (OBP2) is part of a regulatory network controlling glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* **47**, 10-24.
- Smith, H., and Whitelam, G.C. (1997). The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant, Cell & Environment* **20**, 840-844.
- Snow, M., and Snow, R. (1942). The determination of axillary buds. *New Phytol.* **41**, 13-22.
- Snowden, K.C., Simkin, A.J., Janssen, B.J., Templeton, K.R., Loucas, H.M., Simons, J.L., Karunairetnam, S., Gleave, A.P., Clark, D.G., and Klee, H.J. (2005). The Decreased apical dominance1/*Petunia hybrida* CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 Gene Affects Branch Production and Plays a Role in Leaf Senescence, Root Growth, and Flower Development. *Plant Cell* **17**, 746-759.
- Sorefan, K., Booker, J., Haurogne, K., Goussot, M., Bainbridge, K., Foo, E., Chatfield, S., Ward, S., Beveridge, C., Rameau, C., and Leyser, O. (2003). MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea. *Genes Dev* **17**, 1469-1474.
- Sorrels, M.E., Harris, R.E., Lonnquist, J.H. (1978). Response of prolific and nonprolific maize to growth-regulating chemicals. *Crop Sci* **18**, 783-787.
- Spielmeyer, W., and Richards, R. A. (2004). Comparative mapping of wheat chromosome 1AS which contains the tiller inhibition gene (*tin*) with rice chromosome 5S. *Theoretical and Applied Genetics* **109**, 1303 - 1310.
- Statistica5.1. (1995). STATISTICA for Windows [Computer program manual]. (Tulsa. OK: StatSoft, Inc., 2300. East 14th Street, Tulsa, OK.).
- Staton, J.M., Thomson, A.M., and Leedman, P.J. (2000). Hormonal regulation of mRNA stability and RNA-protein interactions in the pituitary. *J Mol Endocrinol* **25**, 17-34.
- Steer, B.T., and Hocking, P. J. (1983). Leaf and Floret Production in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) as Affected by Nitrogen Supply. *Annals of Botany* **52**, 267-277.
- Steeves, T.A. and Sussex, I. M. (1989). Patterns in Plant Development. (Cambridge: Cambridge University Press.).
- Steiner-Lange, S., Unte, U.S., Eckstein, L., Yang, C., Wilson, Z.A., Schmelzer, E., Dekker, K., and Saedler, H. (2003). Disruption of *Arabidopsis thaliana* MYB26 results in male sterility due to non-dehiscent anthers. *The Plant Journal* **34**, 519-528.
- Stirnberg, P., Chatfield, S.P., and Leyser, H.M. (1999). AXR1 acts after lateral bud formation to inhibit lateral bud growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **121**, 839-847.
- Stirnberg, P., van De Sande, K., and Leyser, H.M. (2002). MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development* **129**, 1131-1141.
- Stirnberg, P., Furner, I.J., and Ottoline Leyser, H.M. (2007). MAX2 participates in an SCF complex which acts locally at the node to suppress shoot branching. *Plant J* **50**, 80-94.
- Stracke, R., Werber, M., and Weisshaar, B. (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 447-456.
- Sung, S., and Amasino, R.M. (2004). Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* **427**, 159-164.
- Sussex, I.M. (1989). Developmental programming of the shoot meristem. *Cell* **56**, 225-229.
- Suzuki, T., Sakurai, K., Ueguchi, C., and Mizuno, T. (2001). Two Types of Putative Nuclear Factors that Physically Interact with Histidine-Containing Phosphotransfer (Hpt) Domains, Signaling Mediators in His-to-Asp Phosphorelay, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **42**, 37-45.
- Swigonova, Z., Lai, J., Ma, J., Ramakrishna, W., Llaca, V., Bennetzen, J.L., and Messing, J. (2004). Close Split of Sorghum and Maize Genome Progenitors. *Genome Res.* **14**, 1916-1923.
- Takada, S., Hibara, K., Ishida, T., and Tasaka, M. (2001). The CUP-SHAPED COTYLEDON1 gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development* **128**, 1127-1135.
- Takeda, T., Suwa, Y., Suzuki, M., Kitano, H., Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Matsuoaka, M., and Ueguchi, C. (2003). The OsTB1 gene negatively regulates lateral branching in rice. *Plant J* **33**, 513-520.

- Takeda, T., Amano, K., Ohto, M., Nakamura, K., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., and Ueguchi, C. (2006). RNA interference of the Arabidopsis putative transcription factor TCP16 gene results in abortion of early pollen development. *Plant Molecular Biology* **61**, 165-177.
- Talbert, P.B., Adler, H.T., Parks, D.W., and Comai, L. (1995). The REVOLUTA gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **121**, 2723-2735.
- Tamas, I.A., Ozbun, J.L., Wallace, D.H., Powell, L.E., and Engels, C.J. (1979). Effect of Fruits on Dormancy and Absciscic Acid Concentration in the Axillary Buds of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* **64**, 615-619.
- Tamas, I.A., Engels, C.J., Kaplan, S.L., Ozbun, J.L., and Wallace, D.H. (1981). Role of Indoleacetic Acid and Absciscic Acid in the Correlative Control by Fruits of Axillary Bud Development and Leaf Senescence. *Plant Physiol.* **68**, 476-481.
- Tan, B.C., Joseph, L.M., Deng, W.T., Liu, L., Li, Q.B., Cline, K., and McCarty, D.R. (2003). Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *Plant J* **35**, 44-56.
- Tanaka, M., Takei, K., Kojima, M., Sakakibara, H., and Mori, H. (2006). Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *The Plant Journal* **45**, 1028-1036.
- Tantikanjana, T., Yong, J.W.H., Letham, D.S., Griffith, M., Hussain, M., Ljung, K., Sandberg, G., and Sundaresan, V. (2001). Control of axillary bud initiation and shoot architecture in *Arabidopsis* through the SUPERSHOOT gene. *Genes Dev.* **15**, 1577-1588.
- Tatematsu, K., Ward, S., Leyser, O., Kamiya, Y., and Nambara, E. (2005). Identification of cis-Elements That Regulate Gene Expression during Initiation of Axillary Bud Outgrowth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **138**, 757-766.
- Tatematsu, K., Nakabayashi, K., Kamiya, Y., and Nambara, E. Transcription factor AtTCP14 regulates embryonic growth potential during seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **0**.
- Thimann, K.V., and Skoog, F. (1933). Studies on the Growth Hormone of Plants: III. The Inhibiting Action of the Growth Substance on Bud Development. *Proc Natl Acad Sci USA* **19**, 714-716.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., and Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**, 661-665.
- Thomann, A., Dieterle, M., and Genschik, P. (2005). Plant CULLIN-based E3s: phytohormones come first. *FEBS Lett* **579**, 3239-3245.
- Thomas, T.H. (1972). The distribution of hormones in relation to apical dominance in Brussels Sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera* L.) plants. *J Exp Bot* **23**, 294-301.
- Till, B.J., Reynolds, S.H., Greene, E.A., Codomo, C.A., Enns, L.C., Johnson, J.E., Burtner, C., Odden, A.R., Young, K., Taylor, N.E., Henikoff, J.G., Comai, L., and Henikoff, S. (2003). Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Res* **13**, 524-530.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., and Quail, P.H. (2003). The Arabidopsis Basic/Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family. *Plant Cell* **15**, 1749-1770.
- Tremousaygue, D., Garnier, L., Bardet, C., Dabos, P., Herve, C., and Lescure, B. (2003). Internal telomeric repeats and 'TCP domain' protein-binding sites co-operate to regulate gene expression in *Arabidopsis thaliana* cycling cells. *Plant J* **33**, 957-966.
- Tucker, D.J., and Mansfield, T.A. (1973). Apical Dominance in *Xanthium strumarium*: a discussion in relation to current hypotheses of correlative inhibition. *J. Exp. Bot.* **24**, 731-740.
- Turnbull, C.G., Booker, J.P., and Leyser, H.M. (2002). Micrografting techniques for testing long-distance signalling in *Arabidopsis*. *Plant J* **32**, 255-262.
- Ulmasov, T., Liu, Z.B., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1995). Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell* **7**, 1611-1623.
- Ulmasov, T., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1997). ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* **276**, 1865-1868.
- Van Norman, J.M., and Sieburth, L.E. (2007). Dissecting the biosynthetic pathway for the bypass1 root-derived signal. *Plant J* **49**, 619-628.
- Vernoux, T., Kronenberger, J., Grandjean, O., Laufs, P., and Traas, J. (2000). PIN-FORMED 1 regulates cell fate at the periphery of the shoot apical meristem. *Development* **127**, 5157-5165.
- Vidaurre, D.P., Ploense, S., Krogan, N.T., and Berleth, T. (2007). AMP1 and MP antagonistically regulate embryo and meristem development in *Arabidopsis*. *Development* **134**, 2561-2567.
- Volpi, S., Rabadan-Diehl, C., Cawley, N., and Aguilera, G. (2002). Transcriptional regulation of the pituitary vasopressin V1b receptor involves a GAGA-binding protein. *J Biol Chem* **277**, 27829-27838.
- Vroemen, C.W., Mordhorst, A.P., Albrecht, C., Kwaaitaal, M.A.C.J., and de Vries, S.C. (2003). The CUP-SHAPED COTYLEDON3 Gene Is Required for Boundary and Shoot Meristem Formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 1563-1577.

- Wang, R., Stec, A., Hey, J., Lukens, L., and Doebley, J. (1999). The limits of selection during maize domestication. *Nature* **398**, 236-239.
- Wanke, D., Hohenstatt, M., Berendzen, K.W., Hummel, S., Kilian, J., Kolukisaoglu, Ü., Harter, K. (2007). The plant specific BPC/BBR family of GAGA-repeat Binding proteins. In 18th ICAR (Beijing, China).
- Ward, S.P., and Leyser, O. (2004). Shoot branching. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 73-78.
- Weir, I., Lu, J., Cook, H., Causier, B., Schwarz-Sommer, Z., and Davies, B. (2004). CUPULIFORMIS establishes lateral organ boundaries in Antirrhinum. *Development* **131**, 915-922.
- Welchen, E., and Gonzalez, D.H. (2006). Overrepresentation of Elements Recognized by TCP-Domain Transcription Factors in the Upstream Regions of Nuclear Genes Encoding Components of the Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Machinery. *Plant Physiol.* **141**, 540-545.
- Weltmeier, F., Ehlert, A., Mayer, C.S., Dietrich, K., Wang, X., Schütze, K., Alonso, R., Harter, K., Vicente-Carbajosa, J., and Dröge-Laser, W. (2006). Combinatorial control of Arabidopsis proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors. *The EMBO Journal* **25**, 3133-3143.
- Wenkel, S., Emery, J., Kathy Barton, K. (2007). Feedback control of leaf polarity by a family of small leucine zipper proteins. In 18th ICAR (Beijing, China).
- White, J. (1979). The plant as a metapopulation. *Annu Rev Ecol Syst* **10**, 109-145.
- White, J.C., and Mansfield, T. A. (1978). Correlative Inhibition of Lateral Bud Growth in *Phaseolus vulgaris* L.-Influence of the Environment. *Annals of Botany* **42**, 191-196.
- Whitelam, G.C. and Smith, H. (1991). Retention of phytochrome-mediated shade avoidance responses in phytochrome-deficient mutants of *Arabidopsis*, cucumber and tomato. *J. Plant Physiol.* **39**, 119-125.
- Wilusz, C.J., and Wilusz, J. (2004). Bringing the role of mRNA decay in the control of gene expression into focus. *Trends Genet* **20**, 491-497.
- Woo, H.R., Chung, K.M., Park, J.-H., Oh, S.A., Ahn, T., Hong, S.H., Jang, S.K., and Nam, H.G. (2001). ORE9, an F-Box Protein That Regulates Leaf Senescence in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**, 1779-1790.
- Wood, C.C., Robertson, M., Tanner, G., Peacock, W.J., Dennis, E.S., and Helliwell, C.A. (2006). The Arabidopsis thaliana vernalization response requires a polycomb-like protein complex that also includes VERNALIZATION INSENSITIVE 3. *PNAS* **103**, 14631-14636.
- Xie, D.-X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., and Turner, J.G. (1998). COI1: An Arabidopsis Gene Required for Jasmonate-Regulated Defense and Fertility. *Science* **280**, 1091-1094.
- Yanagisawa, S. (2002). The Dof family of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* **7**, 555-560.
- Yanagisawa, S., and Schmidt, R.J. (1999). Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *Plant J* **17**, 209-214.
- Yang, X., Li, J., Pei, M., Gu, H., Chen, Z. Qu, L.-J. (2007). Over-expression of a flower-specific transcription factor gene AtMYB24 causes aberrant anther development. *Plant Cell Reports* **26**, 219 - 228.
- Yao, X., Ma, H., Wang, J. and Zhang, D. (2007). Genome-Wide Comparative Analysis and Expression Pattern of TCP Gene Families in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**, 885-897.
- Yin, X.-J., Volk, S., Ljung, K., Mehlmer, N., Dolezal, K., Ditengou, F., Hanano, S., Davis, S.J., Schmelzer, E., Sandberg, G., Teige, M., Palme, K., Pickart, C., and Bachmair, A. (2007). Ubiquitin Lysine 63 Chain Forming Ligases Regulate Apical Dominance in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 1898-1911.
- Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G.K.-S., Li, S., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y., Zhang, X., Cao, M., Liu, J., Sun, J., Tang, J., Chen, Y., Huang, X., Lin, W., Ye, C., Tong, W., Cong, L., Geng, J., Han, Y., Li, L., Li, W., Hu, G., Huang, X., Li, W., Li, J., Liu, Z., Li, L., Liu, J., Qi, Q., Liu, J., Li, L., Li, T., Wang, X., Lu, H., Wu, T., Zhu, M., Ni, P., Han, H., Dong, W., Ren, X., Feng, X., Cui, P., Li, X., Wang, H., Xu, X., Zhai, W., Xu, Z., Zhang, J., He, S., Zhang, J., Xu, J., Zhang, K., Zheng, X., Dong, J., Zeng, W., Tao, L., Ye, J., Tan, J., Ren, X., Chen, X., He, J., Liu, D., Tian, W., Tian, C., Xia, H., Bao, Q., Li, G., Gao, H., Cao, T., Wang, J., Zhao, W., Li, P., Chen, W., Wang, X., Zhang, Y., Hu, J., Wang, J., Liu, S., Yang, J., Zhang, G., Xiong, Y., Li, Z., Mao, L., Zhou, C., Zhu, Z., Chen, R., Hao, B., Zheng, W., Chen, S., Guo, W., Li, G., Liu, S., Tao, M., Wang, J., Zhu, L., Yuan, L., and Yang, H. (2002). A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science* **296**, 79-92.
- Zhao, Y., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Cashman, J.R., Cohen, J.D., Weigel, D., and Chory, J. (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* **291**, 306-309.
- Zhou, D.-X. (1999). Regulatory mechanism of plant gene transcription by GT-elements and GT-factors. *Trends in Plant Science* **4**, 210-214.
- Zhou, H., Manji, S.S., Findlay, D.M., Martin, T.J., Heath, J.K., and Ng, K.W. (1994). Novel action of retinoic acid. Stabilization of newly synthesized alkaline phosphatase transcripts. *J. Biol. Chem.* **269**, 22433-22439.
- Zhou, C., Miki, B., and Wu, K. (2003). CHB2, a member of the SWI3 gene family, is a global regulator in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **52**, 1125-1134.

## *Bibliografía*

---

Zubko, E., Adams, C.J., Machaekova, I., Malbeck, J., Scollan, C., and Meyer, P. (2002). Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants. *Plant J* **29**, 797-808.

## **Anexo I**



**Tabla 1.** Cebadores utilizados en este trabajo.

<b>Genotipado</b>		
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Descripción</b>
PromH	TGGTAAATATATGTTCTGTCAAGAACTGT	(-1721)pBRC1, 5'
PromB	ACATACATTTATATGTCTATTTTGGGTGA	(-1522)pBRC1, 5'
PromD	CTGATCTGTATGGTTTCTTGAGGGATCGC	(-912)pBRC1, 5'
Brc1-J-5'	TTTtaggcATCTTTtagTGCATGC	(-838)pBRC1, 5'
Brc1-K-5'	AAGAACATAAACAAACACAAGGTCC	(-687)pBRC1, 5'
TCP18M	CTATAATTAGGACCTTGTGTTTGTATGT	(-652)pBRC1, 5'
Brc1-L-5'	ATATTTTATCATGCCGAAGCTAGG	(-585)pBRC1, 5'
PromA	TGAACCTCAATTGGATTCCAATAAGTCTACGT	(-580)pBRC1, 5'
Brc1-N-5'	CTTCTCTCCATTCTAGTTCATAGC	(-435)pBRC1, 5'
TCP18Q	GTCCTTTGCTTCGATAAAGGTATTC	(-360)pBRC1, 5'
TCP18X	GTCTTCGTCATTGGAACAGTAACCTTCT	(-162)pBRC1, 5'
TCP18Y	GTGCTGAAGAAGATTATAGTACAAGGTCA	(-91)pBRC1, 5'
BRC1ATG	ATGAACAACAACATTTTCACTACTACC	(0)pBRC1, 5'
TCP18C	GCCTTTTtagGGGTTTTGAAGTAACA	(0)pBRC1, 3'
TCP18W	CGCGACAACCTTTCTCACCATTGGCTGCT	(618)BRC1, 5'
TCP18EX1	GGATATGAGACTCATCGCCGCTGCTGAAGC	(674)BRC1, 3'
TCP18B	GATCCTAACACCGGTCTTAATTAATTAGG	(794)BRC1, 3'
TCP18Z	CTCATCTAGCTCCCATCGACCTTGTTCCT	(994)BRC1, 5'
TCP18FINAL	TAGTGTCATTGAATTGATATACCTACCTC	(1548)BRC1, 3'
TCP12 3'	GGTTGTTGATGGGAATGAAGGGATCAAA	<i>brc2-1</i>
TCP12 5'	ATACTAGTGGCGGCCACCGAGGATGAGGCTGTCT	<i>brc2-1</i>
LB-1	GGCAATCAGCTGTGCCGTCTCACTGGTG	<i>brc1-2</i> y <i>brc2-1</i>
GAB1I	CCCATTGGACGTGAATGTAGACAC	<i>brc1-1</i>
phyBf	GTGGAAGAAGCTCGACCAGGCTTTG	<i>phyB</i> , 5'
phyBr	GTGCTGCGTTCTCAAAACG	<i>phyB</i> , 3'
ifl15	GTGTTTTCAAGGAATTCTAGAAAGAA	<i>ifl1</i> , 5'
ifl13	AGATAACACAAAATTCAGCCATAGA	<i>ifl1</i> , 3'
max1F	GACAAGAAGCTTTTGAGTC	<i>max1-1</i> , 5'
max1R	TGAAGAGGTACCGGAACA	<i>max1-1</i> , 3'
max2F	CGAGAATTTTGACGCCATT	<i>max2-1</i> , 5'
max2R	GTGGTGGCCAATAATCAAGC	<i>max2-1</i> , 3'
Las5	TCACGAGCAGTGTATGCAAGAAGCAGT	<i>las4</i> , 5'
Las3	CTCCAGTTCGGTTAATCCGGTTACAT	<i>las4</i> , 3'
1phyAf	GTCACAAGATCTGATCATGGC	<i>phyA</i> , 5'
1phyAr	CTGATTGCTTTGCCAGCGAG	<i>phyA</i> , 3'
2phyAf	TTATCCACAGGTTACAGGG	<i>phyA</i> , 5'
2phyAr	GCATTCTCCTGCATCATCC	<i>phyA</i> , 3'
attB1	ACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT	construcciones con tecnología Gateway®
attB2	TGGGTCGAAAGAACATGTTTACCA	construcciones con tecnología Gateway®
TOM1F1	GCTAGGTATAGGTGTATATAAGTGGC	Secuenciación promotor <i>SITCP1</i>
TOM1F2	GCTAGGTATAGGTGTATATAAGTGGC	Secuenciación promotor <i>SITCP1</i>
M13F	GTTTCCCAGTCACGAC	construcciones en pGEM-T
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	construcciones en pGEM-T
attL1	TCGCGTTAACCTAGCATGGATCTC	construcciones con tecnología Gateway®
attL2	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	construcciones con tecnología Gateway®
VP16BRC-3'	TCTATCAATAAAATTCTAATTCCTAAA	construcciones en pAlligator1
VP16BRC-5'	GGGGGGGATCCTCTAGTAAGGATGGCATACCCATA	construcciones en pAlligator1
GUS4	TTCGGTATAAAGACTTCGCGCTGATACCAG	construcciones con GUS, 200 pb del ATG, 3'
sGFP1	CCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCT	construcciones con GFP, 247 pb del ATG, 3'
BSR	ATGCTTCCGCTCGTATGTTGTGTGG	deleciones internas de pBRC1, 5'
CR4	TCTGGTATCAGCGCAAGTCTTT	deleciones internas de pBRC1, 3'
1.7 BRC2	GCAAGAATCACTTGCAATTATGATGGTTAC	(-1707)pBRC2
1.4 BRC2	GAGATGAAGATGCCAATATTATCATCCAAT	(-1388)pBRC2

**Tabla 1 (cont.)**

1.0 BRC2	GCTGAACCTCGTATAATGAGACTACAAGTT	(-975)pBRC2
0.7 BRC2	CATTGCACATGCATTAAAAACCATGTTTTC	(-741)pBRC2
0.4 BRC2	GGACAACCTTTTGAAGCAGAAGGTAGGGTA	(-409)pBRC2
TCP12 3'	GGTTGTTTGATGGGAATGAAG	(0)pBRC2

### Construcciones

Nombre	Secuencia (5'-3')	Descripción
BRC1-1700	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> CTGATCTGTATGGTTTTCTTGAGGGAT CGC <sup>a</sup>	(-1762)pBRC1, 5'
BRC1-1400	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> TTCTTTCTTACGGTGAAATGCAAA	(-1371)pBRC1, 5'
BRC1-1000	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> ATAATTTAAATAAAGATCTGTTTA	(-1002)pBRC1, 5'
BRC1-700	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> CTATCTCAAAGAAATATAAGAACA	(-704)pBRC1, 5'; test de complementación
BRC1-600	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> ATCATGCCGAAGCTAGGAATTAAG	(-600)pBRC1, 5'
BRC1-500	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> AATGATCTCTTTGCCTCTCTCTCC	(-493)pBRC1, 5'
BRC1-400	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> GTTCATAGCACATAGACTCATTTA	(-419)pBRC1, 5'
BRC1-300	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> CTCTCTCTACACATTAGACACAC	(-337)pBRC1, 5'
BRC1-R	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG</u> TGCCTTTTAGGGGTTTTGAAGTAA	(0)pBRC1, 3'
1.7 BRC2	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> GCAAGAATCACTTGCAATTATTGAT	(-1707)pBRC2, 5'
1.6 BRC2	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> TCTCTTTAGATATACAAATTGGT	(-1600)pBRC2, 5'
1.5 BRC2	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> GAGATGAAGTTTTACAATCATAG	(-1500)pBRC2, 5'
1.4 BRC2	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> GAGATGAAGATGCCAATATTATCA	(-1388)pBRC2, 5'
1.0 BRC2	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> GCTGAACCTCGGTATAATGAGACTA	(-975)pBRC2, 5'
0.7 BRC2	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> CATTGCACATGCATTAATAAACCAT	(-741)pBRC2, 5'
0.4 BRC2	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> GGACAACCTTTTGAAGCAGAAGGT	(-409)pBRC2, 5'
Brc2R	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG</u> TGGTTGTTTGATGGGGAATGAAGGGA	(0)pBRC2, 3'
LP1F	ATT <u>AAGCTT</u> ATCATGCCGAAGCTAGGAATTAAGAA <sup>d</sup>	Delección interna pBRC1, 5'
LP1R	CCAT <u>CTAGAT</u> TATGGGGAAGGAACAACATATAAGC	Delección interna pBRC1, 3'
LP2F	ATT <u>AAGCTT</u> ATCATGCCGAAGCTAGGAATTAAGAA <sup>d</sup>	Delección interna pBRC1, 5'
LP2R	CCA <u>TCTAGACT</u> AGAATGGAGAGAAAGAGAGAGAAA	Delección interna pBRC1, 3'
LP3F	ATT <u>AAGCTT</u> ACATAAACAAACACAAAGGTCCTAATT	Delección interna pBRC1, 5'
LP3R	CAA <u>TCTAGAA</u> AGGAACAACATATAAGCCTTTGAAAA	Delección interna pBRC1, 3'
LP5F	ATT <u>AAGCTT</u> CATTCTAGTTCATAGCACATAGACTC	Delección interna pBRC1, 5'
LP5R	CCA <u>TCTAGAG</u> TGTGTGTCTAAATGTGTAGAGAGAG	Delección interna pBRC1, 3'
LP500f	ATTAAGCTTCCTTCCCCCATAATGATCTCTTTGCC	Delección interna pBRC1, 5'
18B1	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> TAAATGAACAACAACATTTTCAGTACT	Sobrexpresión de BRC1, 5'
18B2	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG</u> TATACATGTTTTGATAGTTGTGCATG	Sobrexpresión de BRC1, 3'
5' controlpBS	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> ACTCTTCCTTTTCAATATTATTGA	Construcción plásmidos <i>Control::GUS</i> y <i>Control::GFP</i>
3' controlpBS1	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGG</u> TATATTAACGCTTACAATTTAGGTGG	
18UTRB2	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> TCTCTCTACCAAACATATATATCAT	Test de complementación
promD'	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> GAGGGATCGCCATGATTGATGATTCA G	Test de complementación

### Híbrido sencillo

Nombre	Secuencia (5'-3')	Descripción
P1F	ATT <u>GAATTC</u> CTATCTCAAAGAAATATAAGAACATA	Híbrido sencillo en pBRC1, 5'
P1R	CCAT <u>CTAGA</u> TAGAATGGAGAGAAAGAGAGAGAGAAA	Híbrido sencillo en pBRC1, 3'
P5F	ATT <u>GAATTC</u> CATTCTAGTTCATAGCACATAGAC <sup>b</sup>	Híbrido sencillo en pBRC1, 5'
P5R	CCA <u>TCTAGA</u> TGTGTGTCTAAATGTGTAGAGAGAG <sup>c</sup>	Híbrido sencillo en pBRC1, 3'
pHis-F	CAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACA	Genotipado construcciones pBRC1::HIS3, 5'
pHis-R	ATAAACGAAGGCAAAGATGACAGAGCAG	Genotipado construcciones pBRC1::HIS3, 3'
Vpe0046	ACCACTACAATGGATGATG	PCR sobre pGADT7, 5'
Vpe0047	CTATTCGATGATGAAGATACCCC	Secuenciación de pGADT7
Vpe0048	GGTTTTTCAGTATCTACGATT C	PCR sobre pGADT7, 3'

**Tabla 1 (cont.)**

<b>qRT-PCRs</b>		
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Descripción</b>
RT-PCR-BRC1-A	TTCCCAGTGATTAACCAACCAT	qRT-PCR para <i>BRC1</i> , 5'
RT-PCR-BRC1-B	TCCGTAAACTGATGCTGCTC	qRT-PCR para <i>BRC1</i> , 3'
RT-PCR-BRC2-A	TCAAAGAGAAGAACAAGACTATGGA	qRT-PCR para <i>BRC2</i> , 5'
RT-PCR-BRC2-B	CCGAGGTCTCAAATAATCTCATC	qRT-PCR para <i>BRC2</i> , 3'
RT-PCR-actin-A	GACTCAGATCATGTTTGAGACCTTT	qRT-PCR para <i>ACTINA8</i> , 5'
RT-PCR-actin-B	CCAGAGTCCAACACAATACCG	qRT-PCR para <i>ACTINA8</i> , 3'
QGUSF	CTGATAGCGCGTGACAAAAA	qRT-PCR para <i>uidA</i> , 5'
QGUSR	CGGTTCGTTGGCAATACTC	qRT-PCR para <i>uidA</i> , 3'
QARR5f	TCAGAGAACATCTTGCCTCGT	qRT-PCR para <i>ARR5</i> , 5'
QARR5r	ATTTCACAGGCTTCAATAAGAAATC	qRT-PCR para <i>ARR5</i> , 3'
QARR5r	ATTTCACAGGCTTCAATAAGAAATC	qRT-PCR para <i>ARR5</i> , 3'

<sup>a</sup>Subrayada se indica la secuencia de los extremos attB.

<sup>b</sup>Con doble subrayado se indica el adaptador para EcoRI.

<sup>c</sup>subrayado punteado, adaptador para XbaI.

<sup>d</sup>subrayado discontinuo, adaptador para HindIII.

**Tabla 2.** Plásmidos desarrollados en este trabajo.

Plásmido	Descripción
$\Delta^{1.7}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	1762 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC1</i> amplificadas por PCR con Pwo usando los cebadores BRC1-1700 y BRC1r a partir de DNA genómico. Este fragmento se clonó en 5' del gen delator <i>uidA</i> del plásmido pGWB3 usando la tecnología Gateway® (Invitrogen) <sup>1</sup>
$\Delta^{1.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	1.371 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC1</i> amplificadas por PCR con Pwo usando los cebadores BRC1-1400 y BRC1r a partir de DNA genómico. Este fragmento se clonó en 5' del gen delator <i>uidA</i> del plásmido pGWB3 usando la tecnología Gateway®
$\Delta^{1.0}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	1002 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC1</i> amplificadas por PCR con Pwo usando los cebadores BRC1-1000 y BRC1r a partir de DNA genómico. Este fragmento se clonó en 5' del gen delator <i>uidA</i> del plásmido pGWB3 usando la tecnología Gateway®
$\Delta^{0.7}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	704 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC1</i> amplificadas por PCR con Pwo usando los cebadores BRC1-700 y BRC1r a partir de DNA genómico. Este fragmento se clonó en 5' del gen delator <i>uidA</i> del plásmido pGWB3 usando la tecnología Gateway®
$\Delta^{0.6}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	600 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC1</i> amplificadas por PCR con Pwo usando los cebadores BRC1-600 y BRC1r a partir del plásmido $\Delta^{1.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$ . Este fragmento se clonó en 5' del gen delator <i>uidA</i> del plásmido pGWB3 usando la tecnología Gateway®
$\Delta^{0.5}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	504 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC1</i> amplificadas por PCR con Pwo usando los cebadores BRC1-500 y BRC1r a partir del plásmido $\Delta^{1.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$ . Este fragmento se clonó en 5' del gen delator <i>uidA</i> del plásmido pGWB3 usando la tecnología Gateway®
$\Delta^{0.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	419 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC1</i> amplificadas por PCR con Pwo usando los cebadores BRC1-400 y BRC1r a partir del plásmido $\Delta^{1.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$ . Este fragmento se clonó en 5' del gen delator <i>uidA</i> del plásmido pGWB3 usando la tecnología Gateway®
$\Delta^{0.3}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	337 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC1</i> amplificadas por PCR con Pwo usando los cebadores BRC1-300 y BRC1r a partir del plásmido $\Delta^{1.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$ . Este fragmento se clonó en 5' del gen delator <i>uidA</i> del plásmido pGWB3 usando la tecnología Gateway®
$\Delta^{0.7-0.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	El fragmento entre 704 y 419 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC1</i> se amplificó por PCR con Pwo usando los cebadores LP500f y LP2R a partir del plásmido $\Delta^{1.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$ y se insertó en los sitios XbaI y HindIII en 5' del promotor mínimo de 35S fusionado al gen <i>uidA</i> del plásmido pTi0046
$\Delta^{0.6-0.5}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	El fragmento entre 600 y 504 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC1</i> se amplificó por PCR con Pwo usando los cebadores LP1F y LP1R a partir del plásmido $\Delta^{1.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$ y se insertó en los sitios XbaI y HindIII en 5' del promotor mínimo de 35S fusionado al gen <i>uidA</i> del plásmido pTi0046
$\Delta^{0.66-0.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	El fragmento entre 663 y 419 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC1</i> se amplificó por PCR con Pwo usando los cebadores LP3F y LP3R a partir del plásmido $\Delta^{1.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$ y se insertó en los sitios XbaI y HindIII en 5' del promotor mínimo de 35S fusionado al gen <i>uidA</i> del plásmido pTi0046
$\Delta^{0.6-0.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	El fragmento entre 600 y 419 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC1</i> se amplificó por PCR con Pwo usando los cebadores LP2F y LP2R a partir del plásmido $\Delta^{1.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$ y se insertó en los sitios XbaI y HindIII en 5' del promotor mínimo de 35S fusionado al gen <i>uidA</i> del plásmido pTi0046
$\Delta^{0.5-0.3}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	El fragmento entre 504 y 337 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC1</i> se amplificó por PCR con Pwo usando los cebadores LP500f y LP5R a partir del plásmido $\Delta^{1.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$ y se insertó en los sitios XbaI y HindIII en 5' del promotor mínimo de 35S fusionado al gen <i>uidA</i> del plásmido pTi0046
$\Delta^{0.5-0.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	El fragmento entre 419 y 337 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC1</i> se amplificó por PCR con Pwo usando los cebadores LP500f y LP5R a partir del plásmido $\Delta^{1.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$ y se insertó en los sitios XbaI y HindIII en 5' del promotor mínimo de 35S fusionado al gen <i>uidA</i> del plásmido pTi0046
$\Delta^{0.4-0.3}\text{pBRC1}::\text{GUS}$	El fragmento entre 419 y 337 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC1</i> se amplificó por PCR con Pwo usando los cebadores LP5F y LP5R a partir del plásmido $\Delta^{1.4}\text{pBRC1}::\text{GUS}$ y se insertó en los sitios XbaI y HindIII en 5' del promotor mínimo de 35S fusionado al gen <i>uidA</i> del plásmido pTi0046
$\Delta^{1.7}\text{pBRC2}::\text{GUS}$	1707 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC2</i> amplificadas por PCR con Pwo usando los cebadores 1.7 BRC2 y Brc2R a partir de DNA genómico. Este fragmento se clonó en 5' del gen delator <i>uidA</i> del plásmido pGWB3 usando la tecnología Gateway®
$\Delta^{1.6}\text{pBRC2}::\text{GUS}$	1600 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC2</i> amplificadas por PCR con Pwo usando los cebadores 1.6 BRC2 y Brc2R a partir de DNA genómico. Este fragmento se clonó en 5' del gen delator <i>uidA</i> del plásmido pGWB3 usando la tecnología Gateway®
$\Delta^{1.5}\text{pBRC2}::\text{GUS}$	1500 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC2</i> amplificadas por PCR con Pwo usando los cebadores 1.5 BRC2 y Brc2R a partir de DNA genómico. Este fragmento se clonó en 5' del gen delator <i>uidA</i> del plásmido pGWB3 usando la tecnología Gateway®
$\Delta^{1.4}\text{pBRC2}::\text{GUS}$	1388 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC2</i> amplificadas por PCR con Pwo usando los cebadores 1.4 BRC2 y Brc2R a partir de DNA genómico. Este fragmento se clonó en 5' del gen delator <i>uidA</i> del plásmido pGWB3 usando la tecnología Gateway®
$\Delta^{1.0}\text{pBRC2}::\text{GUS}$	975 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC2</i> amplificadas por PCR con Pwo usando los cebadores 1.0 BRC2 y Brc2R a partir de DNA genómico. Este fragmento se clonó en 5' del gen delator <i>uidA</i> del plásmido pGWB3 usando la tecnología Gateway®
$\Delta^{0.7}\text{pBRC2}::\text{GUS}$	741 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC2</i> amplificadas por PCR con Pwo usando los cebadores 0.7 BRC2 y Brc2R a partir de DNA genómico. Este fragmento se clonó en 5' del gen delator <i>uidA</i> del plásmido pGWB3 usando la tecnología Gateway®

**Tabla 2 (cont.)**

$\Delta^{0.4}$ pBRC2::GUS	409 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC2</i> amplificadas por PCR con Pwo usando los cebadores 0.4 BRC2 y Brc2R a partir de DNA genómico. Este fragmento se clonó en 5' del gen delator <i>uidA</i> del plásmido pGWB3 usando la tecnología Gateway®
Control::GUS	El plásmido pENTR4 se digirió con EcoRI y se religó, eliminándose el gen letal <i>ccdB</i> . Este plásmido modificado se usó directamente como clon <i>entry</i> para hacer LR con pGWB3. Así, la secuencia en 5' del gen <i>uidA</i> usada como control es la presente en pENTR4 entre los sitios attL1 y attL2, salvo la que hay entre los sitios EcoRI
Control::GFP	El plásmido pENTR4 se digirió con EcoRI y se religó, eliminándose el gen letal <i>ccdB</i> . Este plásmido modificado se usó directamente como clon <i>entry</i> para hacer LR con pGWB4. Así, la secuencia en 5' del gen <i>uidA</i> usada como control es la presente en pENTR4 entre los sitios attL1 y attL2, salvo la que hay entre los sitios EcoRI
$\Delta^{0.7-0.4}$ pBRC1::HIS3	El fragmento entre 704 y 419 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC1</i> se amplificó por PCR con Pwo usando los cebadores P1F y P1R y se insertó en los sitios EcoRI y XbaI del MCS del plásmido pHis
$\Delta^{0.4-0.3}$ pBRC1::HIS3	El fragmento entre 419 y 337 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC1</i> se amplificó por PCR con Pwo usando los cebadores P5F y P5R y se insertó en los sitios EcoRI y XbaI del MCS del plásmido pHis
$\Delta^{1.7}$ pBRC1::GFP	1762 pb de la región 5' reguladora de <i>BRC1</i> amplificadas por PCR con Pwo usando los cebadores BRC1-1700 y BRC1r a partir de DNA genómico. Este fragmento se clonó en 5' del gen delator <i>sGFP</i> del plásmido pGWB-4 usando la tecnología Gateway®
p35S::BRC1::GFP	El cDNA de <i>BRC1</i> clonado en pGEM-T se amplificó por PCR con Pwo usando los cebadores 18B1 y 18B2 insertándose entre el promotor de 35S y el gen <i>sGFP</i> del plásmido pGWB5 usando la tecnología Gateway®
p35S::GFP::BRC1	El cDNA de <i>BRC1</i> clonado en pGEM-T se amplificó por PCR con Pwo usando los cebadores 18B1 y 18B2 insertándose en 3' del gen <i>sGFP</i> del plásmido pGWB6 usando la tecnología Gateway®
p35S::VP16-BRC1	El cDNA de <i>BRC1</i> clonado en pGEM-T se amplificó por PCR con Pwo usando los cebadores 18B1 y 18B2 para insertarse en el plásmido pAlligator1 usando la tecnología Gateway®
$\Delta^{0.7-3'UTR}$ BRC1	El fragmento desde 704 de la región 5' reguladora de <i>BRC1</i> hasta el final de su 3'UTR se amplificó con Pwo usando los cebadores BRC1-700 y 18UTRB2 a partir de DNA genómico. Este fragmento se clonó en el plásmido pGWB1 usando la tecnología Gateway®
$\Delta^{1.7-3'UTR}$ BRC1	El fragmento desde 1762 de la región 5' reguladora de <i>BRC1</i> hasta el final de su 3'UTR se amplificó con Pwo usando los cebadores promD' y 18UTRB2 a partir de DNA genómico. Este fragmento se clonó en el plásmido pGWB1 usando la tecnología Gateway®

<sup>1</sup> Invitrogen, <http://www.invitrogen.com/>. El funcionamiento de la tecnología Gateway® puede encontrarse en <http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=4072>.

## **Anexo II**



VOLUME 19

NUMBER 2

FEBRUARY 2007

A scanning electron micrograph (SEM) of a plant shoot apical meristem. The image shows a central, dome-shaped region of cells, likely the shoot apical meristem, surrounded by more elongated and differentiated cells. The surface of the cells is highly textured, showing various shapes and sizes, and some cells have small, pointed structures extending from them. The overall appearance is that of a complex, three-dimensional cellular structure.

# THE PLANT CELL

CONTROL OF SHOOT BRANCHING PATTERNS

[www.plantcell.org](http://www.plantcell.org)

# ***Arabidopsis* BRANCHED1 Acts as an Integrator of Branching Signals within Axillary Buds** <sup>W</sup>

José Antonio Aguilar-Martínez,<sup>1</sup> César Poza-Carrón,<sup>1</sup> and Pilar Cubas<sup>2</sup>

Departamento de Genética Molecular de Plantas, Centro Nacional de Biotecnología/Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Campus Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

Shoot branching patterns depend on a key developmental decision: whether axillary buds grow out to give a branch or whether they remain dormant in the axils of leaves. This decision is controlled by endogenous and environmental stimuli mediated by hormonal signals. Although genes involved in the long-distance signaling of this process have been identified, the genes responding inside the buds to cause growth arrest remained unknown in *Arabidopsis thaliana*. Here, we describe an *Arabidopsis* gene encoding a TCP transcription factor closely related to *teosinte branched1 (tb1)* from maize (*Zea mays*), **BRANCHED1 (BRC1)**, which represents a key point at which signals controlling branching are integrated within axillary buds. **BRC1** is expressed in developing buds, where it arrests bud development. **BRC1** downregulation leads to branch outgrowth. **BRC1** responds to developmental and environmental stimuli controlling branching and mediates the response to these stimuli. Mutant and expression analyses suggest that **BRC1** is downstream of the **MORE AXILLARY GROWTH** pathway and that it is required for auxin-induced apical dominance. Therefore, **BRC1** acts inside the buds as an integrator of signals controlling bud outgrowth and translates them into a response of cell growth arrest. The conservation of **BRC1/tb1** function among distantly related angiosperm species suggests that a single ancestral mechanism of branching control integration evolved before the radiation of flowering plants.

## **INTRODUCTION**

The vast diversity of plant architectures found in plants today depends largely on the control of branching. Branching patterns determine many aspects of plant form, light interception efficiency, and adaptation to resource availability. Shoot branching patterns are generated during postembryonic development. After germination, the shoot apical meristem (SAM) generates the main shoot, leaf primordia, and new meristems. New shoot meristems formed in the axils of leaves, axillary meristems (AMs), are established at the time of leaf primordia initiation or later in development from groups of cells that retain meristematic potential (Greb et al., 2003; Schmitz and Theres, 2005). After initiation, AMs develop into axillary buds. Branching patterns depend on a key developmental decision: whether axillary buds grow out to give a branch or whether they remain small and dormant in the axils of leaves. This decision is reversibly controlled by developmental and environmental stimuli perceived in different regions of the plant and transduced into the axillary buds to be translated into a local response of growth arrest (Lang et al., 1987; Horvath et al., 2003). This allows the plant to adapt to changing conditions.

In *Arabidopsis thaliana*, axillary bud development is well characterized morphologically (Hempel and Feldman, 1994; Grbic and Bleecker, 2000; Long and Barton, 2000), and some of the genes involved in AM initiation and long-distance signaling have been identified. However, the genes responding to these genetic pathways, acting inside the buds to directly cause cell proliferation arrest, remained unknown.

During prolonged vegetative development, AMs are initiated in an acropetal order, first in the axils of mature leaves distant from the shoot apex and later in younger leaves. After flowering, AMs are initiated in a basipetal order, first in leaf axils closest to the shoot apex (Hempel and Feldman, 1994; Grbic and Bleecker, 2000; Long and Barton, 2000). Genes such as **LATERAL SUPPRESSOR (LAS)**, encoding a GRAS protein (Greb et al., 2003), and the **REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS (RAX)** genes, encoding a group of R2R3 MYB proteins (Keller et al., 2006; Muller et al., 2006), are necessary during AM initiation to maintain the meristematic potential of cells at the base of leaves and to allow the organization of a stem cell niche. **REVOLUTA/INTERFASCICULAR FIBERLESS1 (REV/IFL1)** (Talbert et al., 1995; Ratcliffe et al., 2000; Otsuga et al., 2001; Zhong and Ye, 2001), encoding a Homeobox-Leucine-Zipper protein, is also involved in early stages of AM initiation.

Once initiated, AMs go on to form a bud: first, leaf primordia are formed on the periphery of the AM (vegetative phase), and later, flower meristems are initiated (reproductive phase). Axillary buds bearing flowers may then elongate to give a branch, as in the case of cauline leaf buds, or they may become arrested for most of the plant life, as in the case of many rosette leaf buds. Long-range signaling promoting bud arrest is controlled both by auxin produced in the shoot apex and transported basipetally

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail pcubas@cnb.uam.es; fax 34-915854506.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: Pilar Cubas (pcubas@cnb.uam.es).

<sup>W</sup> Online version contains Web-only data.

www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.106.048934



and by a novel carotenoid derivative synthesized in the root and transported acropetally (Cline, 1991; Shimizu-Sato and Mori, 2001; Leyser, 2003; Dun et al., 2006). *Arabidopsis* mutants with reduced auxin sensitivity (i.e., *auxin-resistant1* [*axr1*]; Chatfield et al., 2000) have weaker apical dominance, and auxin over-producers (i.e., *yucca1* [*ycc1*]; Zhao et al., 2001) have stronger apical dominance than wild-type plants. Also, mutations in the *MORE AXILLARY GROWTH* (*MAX*) genes, which control the synthesis and activity of the carotenoid-derived hormone (MAX-dependent signal) in *Arabidopsis*, cause an excess of branch outgrowth (Stirnberg et al., 2002; Sorefan et al., 2003; Booker et al., 2004, 2005). These two hormones, auxin and the MAX-dependent signal, act outside the axillary buds. Additional mechanisms affecting chromatin structure also seem to be involved (Peng et al., 2006). To date, the genes responding to these signals within the buds to directly cause growth arrest have remained uncharacterized in *Arabidopsis*.

Genes promoting bud arrest locally within the bud have been described in monocots. They are *teosinte branched1* (*tb1*) from maize (*Zea mays*) (Doebley et al., 1997) and its homologs from rice (*Oryza sativa*), *Os tb1* (Hu et al., 2003; Takeda et al., 2003), and sorghum (*Sorghum bicolor*), *Sb tb1* (Kebrom et al., 2006). *tb1*-like genes encode transcription factors containing a TCP domain, a 59-amino acid domain that allows nuclear targeting, DNA binding, and protein-protein interactions (Kosugi and Ohashi, 1997; Cubas et al., 1999a; Kosugi and Ohashi, 2002). *tb1* and *Os tb1* are expressed in AMs and buds, where they suppress growth (Hubbard et al., 2002; Takeda et al., 2003). Their mutants, *tb1* and *fine culm1*, respectively, have enhanced shoot branching (Doebley et al., 1997; Wang et al., 1999; Hu et al., 2003; Takeda et al., 2003). However, the general role of *tb1* in the control of shoot branching in angiosperms remained to be established. First, *tb1*-like genes had not been analyzed in wild species, and second, they had not been studied in dicots; therefore, it was unclear whether this function was conserved in this group.

In this study, we have characterized *BRANCHED1* (*BRC1*) and *BRANCHED2* (*BRC2*), two of the three genes most closely related to *tb1* in the wild dicot *Arabidopsis*. We show that both genes, but mainly *BRC1*, play a central role in the control of axillary bud development. *BRC1* expression patterns are restricted mostly to axillary buds, its activity inversely correlates with bud outgrowth, and *brc1* mutant phenotypes are non-pleiotropic and affect exclusively axillary bud development. Moreover, *BRC1* responds to environmental and endogenous signals controlling bud outgrowth, and our genetic analyses indicate that auxin and the *MAX* pathway act through *BRC1* to promote bud arrest. These results indicate that *BRC1* acts as a local integrator of the genetic pathways controlling branch outgrowth.

## RESULTS

### The *Arabidopsis* TCP Gene Family

To identify the *Arabidopsis* genes closest to *tb1*, the complete *Arabidopsis* TCP gene family was analyzed (Figure 1A). This family comprised 24 genes encoding predicted proteins with a

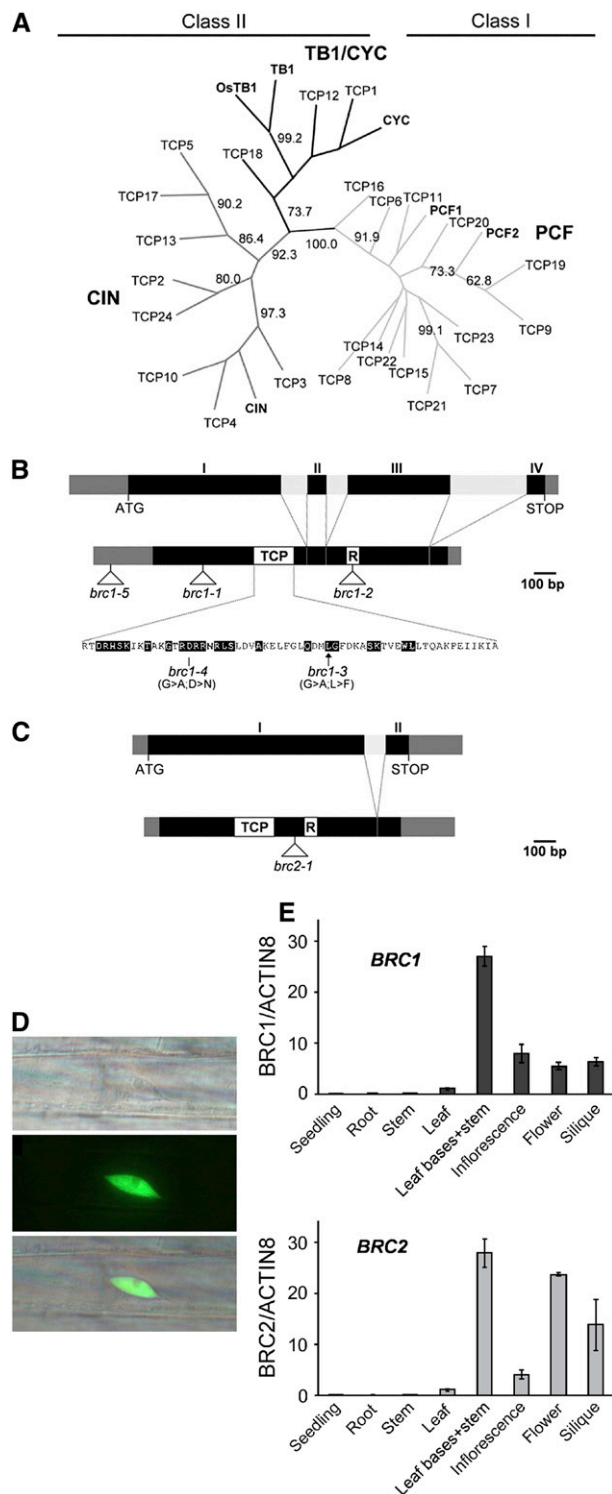
TCP domain (see Supplemental Table 1 and Supplemental Figure 1 online). Phylogenetic analysis of this domain revealed two subfamilies (Cubas et al., 1999a; Cubas, 2002; Kosugi and Ohashi, 2002; Palatnik et al., 2003): class I, formed by 13 predicted proteins related to the PCF rice factors (Kosugi and Ohashi, 1997), and class II, formed by 11 predicted proteins related to the *Antirrhinum* *CYC* and *CIN* genes and to *tb1* (Luo et al., 1996; Doebley et al., 1997; Nath et al., 2003; Palatnik et al., 2003). Class II could be further subdivided into two groups: the CIN group formed by eight members, some of which are involved in the control of leaf primordia growth (Palatnik et al., 2003), and the *tb1*/CYC group (called the ECE group by Howarth and Donoghue [2006]), on which we have focused. Genes from this group have an R domain (see Supplemental Figure 1 online) (Cubas et al., 1999a) that is also present in *TCP2* and *TCP24* from the CIN group. Although in monocots only one type of *tb1*/CYC/ECE gene has been identified (e.g., *tb1*, *Os tb1*, and *Sb tb1*), in eudicots several *tb1*/CYC/ECE genes are found, and phylogenetic analyses have suggested that duplications within this clade occurred at the base of eudicots (Howarth and Donoghue, 2006). Therefore, no *Arabidopsis* TCP gene is a direct ortholog of *tb1*. *TCP1*, the gene most closely related to *CYC*, has been proposed to be the *CYC* ortholog (Cubas et al., 2001). Therefore, *TCP12* and *TCP18* were the only *Arabidopsis* TCP genes that remained as candidates for having retained a role in branching. Based on their similarity to *tb1* in protein sequence, expression patterns, and mutant phenotypes (see below), they were renamed *BRC1* and *BRC2*, respectively.

Full-length cDNAs of *BRC1* and *BRC2* were isolated. None of them corresponded to the predicted transcripts annotated in the *Arabidopsis* genome databases. The cDNA of *BRC1* (1609 bp, three spliced introns; Figure 1B) contained an open reading frame of 1290 bp encoding a protein of 429 amino acids. The *BRC2* cDNA (1380 bp, one spliced intron; Figure 1C) contained an open reading frame of 1071 bp encoding a protein of 356 amino acids. Both predicted proteins had a TCP domain and an R domain.

It has been proposed that the TCP domain is necessary for nuclear localization (Kosugi and Ohashi, 1997; Cubas et al., 1999a), and some TCP proteins have been shown to be targeted to the nuclei in heterologous systems (Suzuki et al., 2001; Qin et al., 2004). To investigate whether *BRC1* and *BRC2* encode nuclear proteins, the cDNAs of *BRC1* and *BRC2* were fused to green fluorescent protein (GFP), and transgenic *Arabidopsis* lines expressing these proteins under the control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter were obtained. GFP:*BRC1* and GFP:*BRC2* were targeted to the nuclei in all tissues analyzed (Figure 1D for GFP:*BRC1*; GFP:*BRC2* not shown). These data support their proposed role as transcriptional regulators. Plants expressing GFP:*BRC1* showed pleiotropic developmental defects and retarded growth (see Supplemental Figure 3 online). Plants expressing GFP:*BRC2* did not show any obvious phenotypic effect.

### *BRC1* and *BRC2* Are Expressed in Axillary Buds

To explore the potential roles of *BRC1* and *BRC2* in the control of plant development, their mRNA levels were analyzed by



**Figure 1.** The *BRC1* and *BRC2* Gene Family, Structure, Transcripts, and Proteins.

**(A)** Unrooted consensus tree showing relationships among the predicted *Arabidopsis* TCP proteins and members of other plant species, *CYC*, *tb1*, *PCFs*, and *CIN*. The percentage of bootstrap samples in which particular

real-time PCR in different tissues (Figure 1E). Both genes were transcribed at high levels in tissue that mainly contained axillary buds, supporting their putative role in the control of bud development. They were also expressed at lower levels (mainly *BRC2*) in other axillary structures such as flowers and siliques.

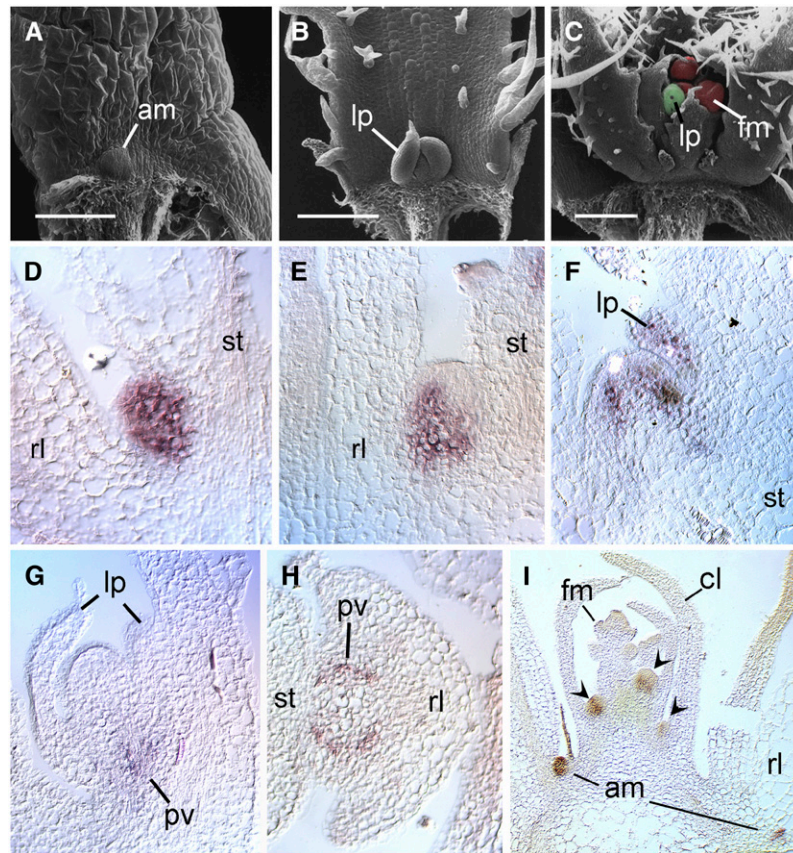
To define the spatial and temporal patterns of expression of these genes during bud development in more detail, *BRC* mRNAs were detected by in situ hybridization. *BRC1* and *BRC2* expression patterns were dynamic and similar, although *BRC1* expression was much stronger than *BRC2* expression, which was barely detectable in our experiments. Before flowering, when AMs were not yet initiated, *BRC1* and *BRC2* transcripts were not detectable (data not shown). After flowering, AMs became visible in the axils of leaves (Figure 2A) and *BRC1* transcripts accumulated in all cell layers of these meristems (Figure 2D). During bud vegetative development (Figure 2B), *BRC1* was downregulated in the outer layers of the meristem (Figure 2E) and transcripts accumulated in young leaf primordia (Figure 2F). Older expanding leaves did not express *BRC1* (Figure 2G). In buds bearing flowers (Figure 2C), *BRC1* transcripts were detectable in the provascular tissue underlying the bud (Figure 2G). *BRC1* expression was downregulated at the time of bud outgrowth, so mRNA was not detectable in buds showing the first signs of shoot elongation (stem < 0.1 mm; data not shown). *BRC1* expression appeared to be highest in rosette leaf buds that remained arrested for long periods of time and lowest in cauline leaf buds that grew out immediately (Figure 2I). Therefore, *BRC1* is expressed locally in axillary buds in an evolving pattern during bud development and is downregulated at the time of branch elongation. *BRC2* expression levels were much lower and were only clearly detectable in the provascular tissue of buds that had undergone flowering (Figure 2H). Neither gene was expressed in the SAM or in floral or leaf primordia derived from the SAM.

clades were monophyletic is indicated when it is 70% or more. Black lines represent the *TB1/CYC* clade, dark gray lines represent the *CIN* clade, and light gray lines represent the *PCF* clade.

**(B)** and **(C)** Genomic and cDNA organization of *BRC1* (**B**) and *BRC2* (**C**). Black boxes represent exons, dark gray boxes represent 5' and 3' untranslated regions, light gray boxes represent introns, and white boxes represent conserved domains. Intron sizes were 116, 93, and 337 bp for introns 1, 2, and 3 of *BRC1*, respectively, and 95 bp for *BRC2*. Triangles indicate sites of T-DNA insertion in the mutants. *brc1-5* is located 186 bp upstream of the ATG. Base pair changes resulting in changes in conserved residues of the TCP domain of *brc1-3* and *brc1-4* are indicated. Residues conserved in class II TCP proteins are represented by black boxes.

**(D)** Nuclear localization of *BRC1*. Top, bright-field image of a transgenic *Arabidopsis* root cell expressing Pro<sub>CaMV35S</sub>:GFP:*BRC1*. Center, UV light view of the same cell; GFP:*BRC1* protein accumulates in the nucleus. Bottom, merged image of **(A)** and **(B)**. Plants carrying nonfused GFP do not accumulate the protein in their nuclei (data not shown).

**(E)** *BRC1* (top) and *BRC2* (bottom) mRNA levels in different tissues analyzed by real-time PCR. Error bars represent SE from three biological replicates. The sample labeled Leaf bases+stem contains dissected rosette tissue highly enriched in axillary buds.



**Figure 2.** *BRC* Gene Expression during Bud Development.

(A) Scanning electron microscopy image of an AM (meristem stage).

(B) Scanning electron microscopy image of a bud of vegetative 1 stage.

(C) Scanning electron microscopy image of a flowering bud (reproductive stage). Leaf primordia (green) and flower buds (red) are highlighted for clarity.

(D) to (I) Sections of *Arabidopsis* rosettes hybridized with digoxigenin-labeled probes complementary to *BRC1* [(D) to (G)] and *BRC2* [(H)] transcripts.

(D) Detail of an AM comparable to that shown in (A).

(E) Detail of an AM beginning to initiate leaf primordia.

(F) Bud of vegetative 1 stage similar to that shown in (B).

(G) Reproductive stage bud similar to that shown in (C).

(H) *BRC2* mRNA accumulates in the developing vascular tissue of flowering buds.

(I) General view of *BRC1* mRNA distribution in a flowering rosette.

(D) to (G) and (I) are longitudinal sections, and (H) is a transverse section. am, axillary meristem; cl, cauline leaf; fm, flower meristem; lp, leaf primordium; pv, provascular tissue; rl, rosette leaf; st, stem. Bars = 200  $\mu$ m.

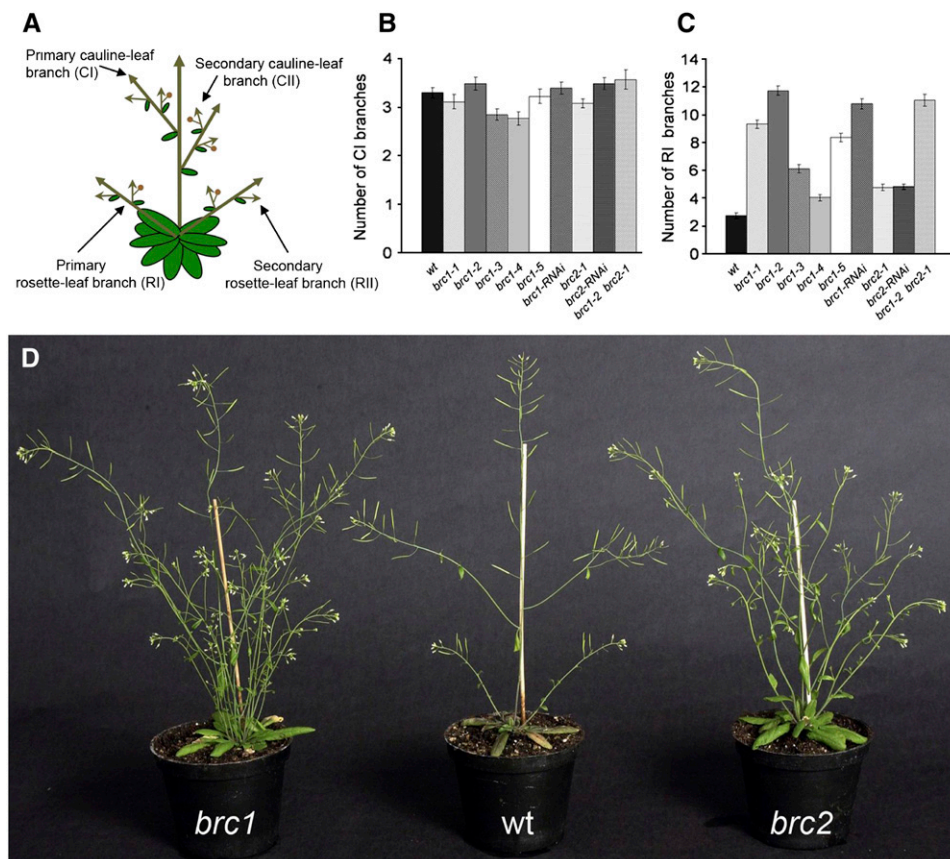
### ***BRC1* and *BRC2* Prevent Axillary Bud Outgrowth**

To investigate the function of *BRC1* and *BRC2* in buds, the phenotype of plants with reduced function of these genes was analyzed. RNA interference (RNAi) lines were generated, and mutant collections were screened for insertions and point mutations affecting transcribed regions of *BRC1* and *BRC2* (Figures 1B and 1C; see Supplemental Table 2 online). For *BRC1*, 12 independent RNAi lines, 3 insertional lines, and 2 point mutant lines were analyzed (Figure 1B). *brc1-1*, *brc1-2*, and *brc1-5* carried T-DNA insertions (Alonso et al., 2003; Rosso et al., 2003) located 218 bp downstream of the ATG (predicting a truncated protein of 72 amino acids), within the R domain (giving a protein

of 208 residues lacking the R domain), and at the 5' untranslated regions of the gene, respectively. *brc1-3* and *brc1-4* carried ethyl methanesulfonate-generated point mutations (Till et al., 2003) causing amino acid changes in conserved residues of the TCP domain. For *BRC2*, eight independent RNAi lines and one insertional line (Alonso et al., 2003) were studied (Figure 1C). *brc2-1* predicted a truncated protein of 208 residues lacking the R domain. The double mutant *brc1-2 brc2-1* was also analyzed.

Three weeks after flowering, *brc1* mutants had a significantly higher number of rosette branches (RI and RII) than wild-type plants (Figures 3A, 3C, and 3D; see Supplemental Table 3 online). The phenotype of *brc2* mutants was weaker but consistently affected RI and RII (Figures 3C and 3D; see Supplemental Table 3





**Figure 3.** Shoot Branching Phenotype of *brc* Mutants.

(A) *Arabidopsis* branching structure.

(B) Number of primary cauline branches (CI).

(C) Number of primary rosette branches (RI). For (B) and (C), one representative RNAi line for each gene was included. Error bars represent SE ( $n = 26$  to 27).

(D) Shoot phenotype of mature *brc1-2*, wild-type Columbia, and *brc2-1* plants.

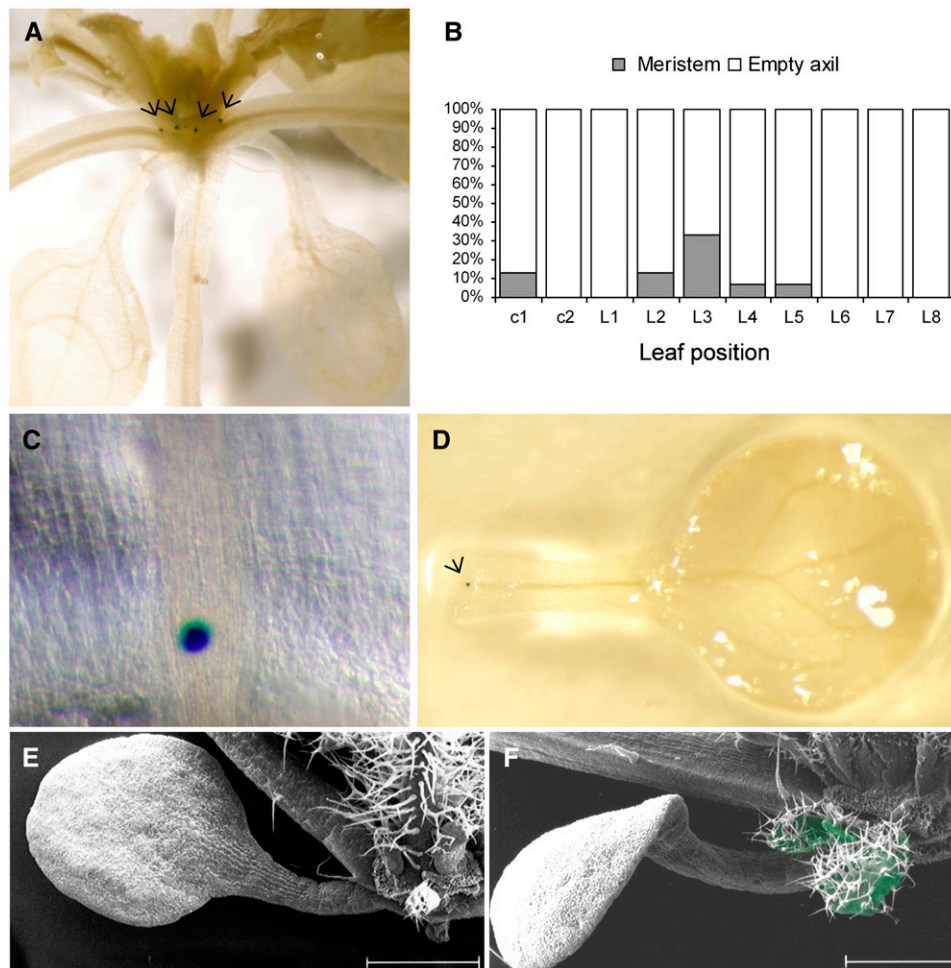
online). Double mutants *brc1-2 brc2-1* had a phenotype similar to that of strong *brc1* mutants (Figure 3C; see Supplemental Table 3 online). The increase in rosette branches of *brc* mutants was not attributable to an increased number of vegetative nodes (see Supplemental Table 3 online) but to an increased frequency of bud outgrowth: for instance, in wild-type individuals, <40% of the RI buds grew out, whereas in *brc1* mutants, almost every RI bud grew. On the other hand, *brc1*, *brc2*, and *brc1 brc2* plants had a similar number of primary and secondary cauline leaf branches (CI and CII) as the wild type (Figures 3A and 3B; see Supplemental Table 3 online). These results indicate that *BRC* genes prevent rosette branch outgrowth.

### ***BRC1* Delays Early Axillary Bud Development**

As *BRC1* was expressed at higher levels and had a stronger mutant phenotype than *BRC2*, we focused mainly on this gene for further studies. The phenotype of *brc1* mutants was investigated during early bud development. Axillary buds formed at identical leaf positions (L1 = first-formed leaf; L2 = second-

formed leaf, etc.) were compared in *brc1-2* and wild-type plants just before flowering of the main shoot at 14 d after germination (Figure 4) and soon before bolting at 25 d after germination (Figure 5). To visualize AM initiation, these lines were studied in a *Pro<sub>CLV3</sub>:GUS* background (Brand et al., 2002) that allows the identification of shoot and flower meristems by GUS staining (Figures 4A and 4C). Under long days, AMs are initiated only after flowering, in a basipetal order (Hempel and Feldman, 1994). Consistently, in wild-type plants, vegetative rosettes did not reveal any sign of AM initiation (data not shown). By contrast, 14-d-old vegetative rosettes of *brc1-2 Pro<sub>CLV3</sub>:GUS* plants had AMs formed in the axils of cotyledons (c1 and c2) and L2 to L5 (Figures 4B and 4D). This finding indicates that *BRC1* prevents AM initiation.

At 25 d after germination, the SAM of wild-type and mutant plants had undergone flowering. In the wild type, buds nearest to the apex (i.e., L12 buds) were more advanced in development than buds farther from the apex (i.e., L1 buds), so that a gradient of developmental stages was found along the nodes: c1 and c2 never had axillary buds, newly formed meristems or empty axils were found in leaves L1 and L2, leaves L3 to L9 had buds in the



**Figure 4.** AM Initiation in *brc1* Mutants.

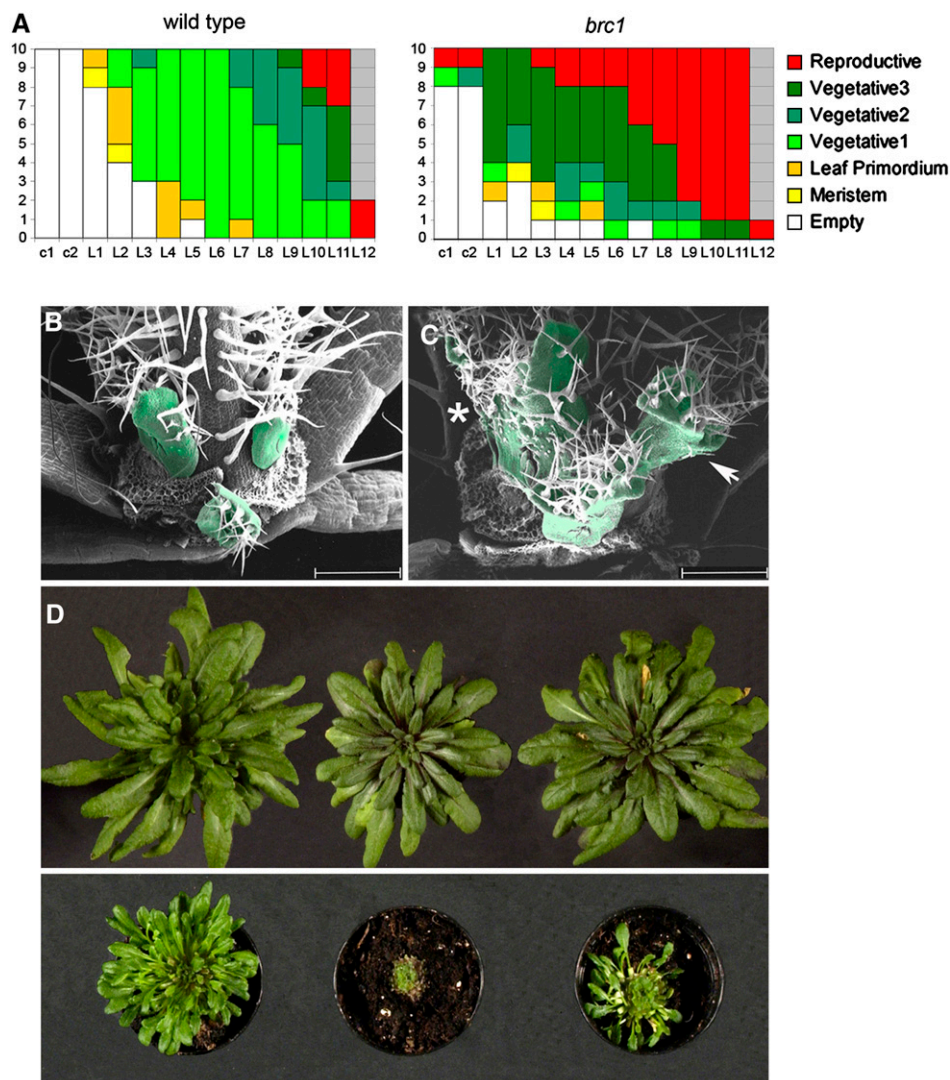
- (A) Flowering *ProCLV3:GUS* rosette stained to visualize GUS activity. Arrows indicate AMs.  
 (B) Percentage of *brc1-2* *CLV3:GUS* individuals with GUS-expressing AMs in different leaf positions at 15 d after germination ( $n = 16$ ). All rosettes were vegetative.  
 (C) Close-up of an AM expressing GUS.  
 (D) AM in the axil of a cotyledon of a vegetative *brc1-2* plant.  
 (E) Empty axil of a wild-type cotyledon.  
 (F) Bud (green) in the axil of a *brc1-2* cotyledon. Bars in (E) and (F) = 1 mm.

early mid vegetative stage, buds in L10 were mostly in late vegetative stages, and a few flowering buds were found in leaves L11 and L12 (Figures 4E, 5A, 5B, and 5D). In *brc1-2* mutants, the gradient of developmental stages was not so obvious: some c1 and c2 had vegetative or flowering buds, most L1 to L6 had buds in the late vegetative stage, and a large fraction of L7 to L12 had flowering buds (Figures 4F, 5A, 5C, and 5D). Mutant buds were not early flowering (they had a wild-type number of vegetative nodes); therefore, this effect should be attributable to rapid vegetative development. Moreover, leaves of the axillary buds grew faster and were larger than wild-type leaves (Figures 5B and 5C). This effect was more dramatic in plants grown under short days, in which wild-type and mutant AMs were initiated before flowering and bud development was prolonged for many weeks (Figure 5D).

Together, these results indicate that *BRC1* retards all stages of bud development: first, it prevents vegetative AM initiation under long days and AM initiation in cotyledons; second, it delays the progression of bud vegetative development and prevents leaf bud growth and/or expansion; and third, it suppresses lateral shoot elongation. *brc* mutants were not affected in any other developmental trait, indicating that *BRC* genes acted exclusively in axillary buds or that their function was redundant in other developmental pathways.

#### ***BRC1* Is Strongly Downregulated in *max* Mutants**

The relation of *BRC1* to the genetic pathways controlling axillary bud development was studied. *BRC1* (and *BRC2*) mRNA levels were analyzed in lines with altered AM initiation (*las* and *rev/iff1*),



**Figure 5.** Early Bud Development in *brc* Mutants.

**(A)** Developmental stages of buds in the axils of cotyledons (c1 and c2) and rosette leaves (L1 to L12) of 10 wild-type (left) and *brc1-2* (right) individuals. Developmental stages are defined in Methods: empty axil (white), meristem (yellow), leaf primordia (orange), vegetative 1 (light green), vegetative 2 (medium green), vegetative 3 (dark green), and reproductive (red).

**(B)** Wild-type buds in the axils of the youngest rosette leaves (removed) in vegetative 2 stage.

**(C)** *brc1* buds in the axils of the youngest rosette leaves in vegetative 3 (arrow) and reproductive (asterisk) stages. In **(B)** and **(C)**, the main shoot is <1 mm long, and axillary buds are highlighted in green for clarity. Bars = 500  $\mu$ m.

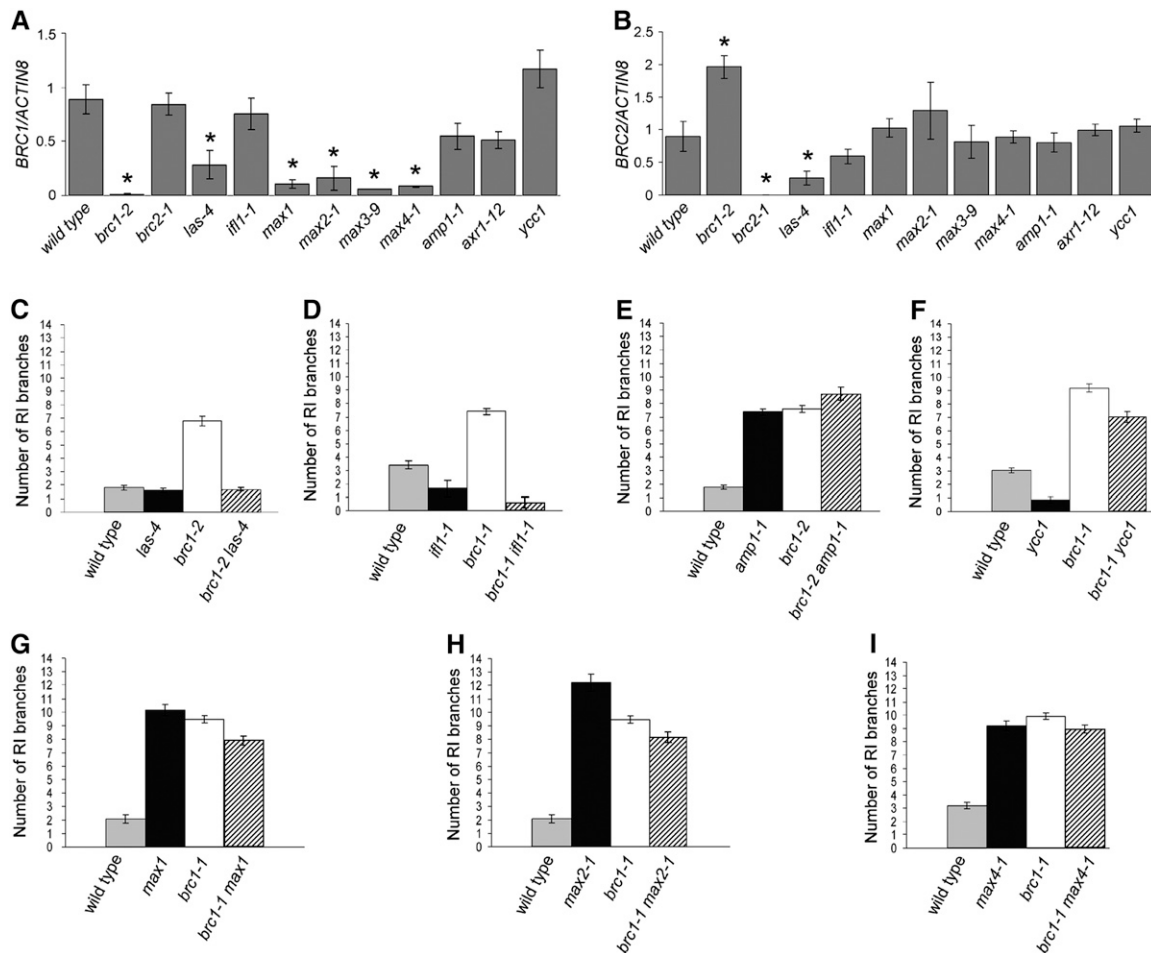
**(D)** Top, vegetative rosettes of plants grown for 50 short days viewed from above. From left to right, *brc1-2*, wild-type Columbia, and *brc2-1*. Bottom, the same plants after removing all of the rosette leaves to display the axillary bud leaves.

bud outgrowth (*ycc1*, *axr1*, and *max1* to *max4*), or both (*amp1*). Moreover, double mutants were obtained between *brc1* mutants and these lines, and their phenotypes were studied. In the mutants *las* (Greb et al., 2003) and *ifl1* (Talbert et al., 1995; Otsuga et al., 2001; Zhong and Ye, 2001), both affected in AM initiation, *BRC1* and *BRC2* levels were reduced, as would be expected if fewer buds were formed compared with the wild type (Figures 6A and 6B). Moreover, *las* and *ifl1* mutations were epistatic to *brc1* (Figures 6C and 6D; see Supplemental Table 4

online), suggesting that *LAS* and *REV/IFL1* are necessary during AM initiation before *BRC1*.

The auxin:cytokinin ratio is a strong determinant of the degree of lateral shoot outgrowth (Sachs and Thimann, 1967; Chatfield et al., 2000). Auxin promotes bud arrest, and cytokinin promotes AM development and shoot outgrowth (Sachs and Thimann, 1964; Turnbull et al., 1997). The *amp1* mutant, for instance, with increased cytokinin levels (Helliwell et al., 2001), has more AMs initiated and more buds that grow out to give a branch





**Figure 6.** *BRC* Genes and Genetic Pathways of AM Development.

*BRC1* (A) and *BRC2* (B) mRNA levels in different mutant backgrounds analyzed by real-time PCR. Error bars represent the SE from three biological replicate experiments. Differences with respect to the wild type that were found to be significant in a Newman–Keuls test are indicated with asterisks. The other panels show the number of RI branches of double mutants of *brc1* with *las4* (C), *ifl1* (D), *amp1* (E), *ycc1* (F), *max1* (G), *max2* (H), and *max4* (I).

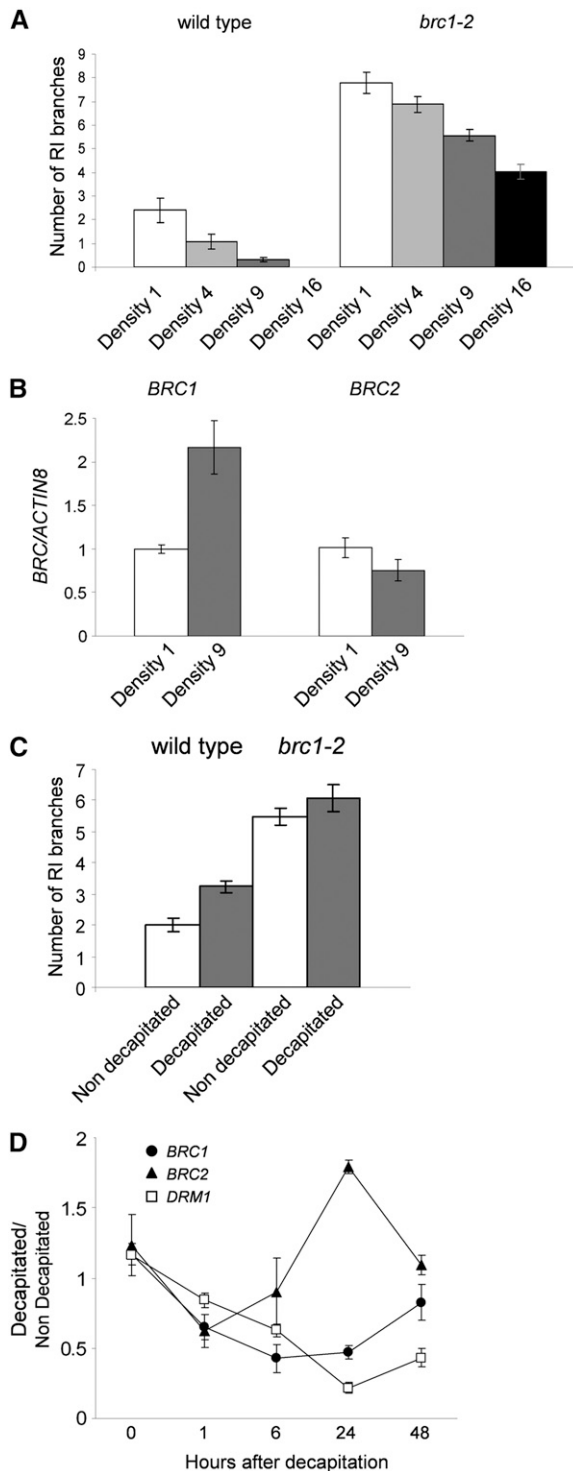
than wild-type plants (Figure 6E; see Supplemental Table 4 online). In *amp1* mutants, *BRC1* levels were reduced slightly (Figure 6A), which could reflect a negative regulation of *BRC1* by cytokinins or simply an effect of more buds elongating at this stage compared with the wild type. *amp1 brc1* double mutants had a higher number of RI branches than the parental lines (Figure 6E), possibly reflecting an additive effect of the extra AMs formed in the *amp1* mutants and the increased outgrowth caused by *brc1*.

The auxin-overproducer *ycc1* mutants (Zhao et al., 2001) had most rosette leaf buds arrested (Figure 6F; see Supplemental Figure 2 and Supplemental Table 4 online), but *BRC1* and *BRC2* mRNA levels were not altered significantly (Figures 6A and 6B). However, *brc1* mutations mostly suppressed the strong apical dominance phenotype of *ycc1* (Figure 6F; see Supplemental Figure 2 online). This finding indicates that loss of *brc1* function can to a great extent overcome the bud arrest caused by an excess of auxin activity. Therefore, although auxin does not

seem to control *BRC1* transcriptionally, *BRC1* activity is necessary for the auxin-induced control of apical dominance.

*MAX* genes promote the synthesis and activity of a carotenoid derivative (Booker et al., 2005) that has been proposed to reduce auxin transport capacity in the stem, thus preventing auxin export from the buds and blocking bud outgrowth (Bennett et al., 2006). The four *max* mutants have an excess of branch outgrowth (Stirnberg et al., 2002; Sorefan et al., 2003; Booker et al., 2004). In these mutants, *BRC1* was downregulated much more strongly than in other branching mutants, such as *amp1* and *axr1* (Figure 6A). In addition, the phenotype of *max brc1* double mutants is similar to those of the single *max* and *brc1* mutant parents (Figures 6G to 6I; see Supplemental Table 4 online), indicating that *MAX* and *BRC1* may act in the same pathway and that the *MAX* effect on branching could be attributable mostly to transcriptional control of *BRC1*.

Finally, an upregulation of *BRC2* was observed in *brc1* mutants, which may reflect a negative feedback mechanism to



**Figure 7.** Response of *BRC* Genes to Branch-Suppressing or Branch-Promoting Stimuli.

**(A)** Number of RI branches of wild-type and *brc1-2* plants grown at different planting densities analyzed at 3 weeks after flowering. Density 1 indicates one plant/pot of 36 cm<sup>2</sup>; density 4 indicates four plants/pot; density 9 indicates nine plants/pot; and density 16 indicates 16 plants/pot. All pots were 6 cm deep. Flowering time was not affected. Error bars represent SE ( $n = 10$  to 42).

compensate for the loss of *BRC1* function (Figure 6B). The reverse (*BRC1* upregulation in *brc2* mutants) was not observed.

Together, these results suggest that during AM initiation, *BRC1* acts after *LAS* and *IFL1*. During bud development, auxin-induced apical dominance requires the activity of *BRC1*, and the *MAX*-mediated pathway controls *BRC1* expression. Cytokinins act in an antagonistic pathway independent of *BRC1*.

### *BRC1* Responds to Signals Controlling Bud Dormancy

The central role of *BRC1* in the control of bud outgrowth raised the possibility that this gene acts as a local switch of axillary bud growth, integrating the responses to different stimuli that control bud dormancy. If that is the case, changes in those stimuli should affect *BRC* mRNA levels or protein activity. To test this hypothesis, *BRC1* and *BRC2* transcript levels were analyzed in plants grown under different environmental and developmental conditions that affected bud arrest.

Planting density is an environmental factor that affects branch outgrowth in many plant species. Plants grown at low density, for example, have more branches than plants grown in crowded conditions as a result of a neighbor-sensing response (Casal et al., 1986). To test whether this is true in *Arabidopsis*, wild-type and *brc1* plants were sown at increasingly higher densities (1, 4, 9, and 16 plants per pot of 36 cm<sup>2</sup>) and RI branches were counted at maturity (Figure 7A). Wild-type plants responded to increased planting density with reduced branching such that, at a density of nine plants per pot, branch suppression was almost complete (86% reduction in branch number with respect to plants grown at one plant per pot). By contrast, *brc1* mutants were partly insensitive to this condition (28% reduction with respect to plants at one plant per pot). *brc2* mutants behaved like wild-type plants, and *brc1 brc2* double mutants behaved like *brc1* mutants (data not shown). The levels of *BRC1* and *BRC2* mRNA were then compared in wild-type plants grown at low (one plant per pot) and high (nine plants per pot) density. At high density, *BRC1* mRNA levels were more than double those at low density, whereas *BRC2* levels were similar in both conditions (Figure 7B). These results indicate that the environmentally induced bud dormancy observed in plants grown at high density was partly mediated through transcriptional regulation of *BRC1* but not of *BRC2*.

Apical dominance is the inhibitory effect caused by an actively growing primary shoot apex on lateral shoot outgrowth (Cline, 1991, 1997). Decapitation is a classical assay to study bud reactivation after release from apical dominance (Sachs and Thimann,

**(B)** *BRC1* and *BRC2* mRNA levels analyzed by real-time PCR at density 9 related to levels at density 1. Error bars represent the SE from three biological replicate experiments.

**(C)** Number of RI branches of wild-type Columbia and *brc1-2* plants at 10 d after removal of the main shoot. Error bars represent SE ( $n = 14$ ). Values were subjected to Student's *t* test. Wild-type differences were significant ( $P < 0.0003$ ), whereas *brc1-2* differences were not significant ( $P < 0.2782$ ).

**(D)** Ratio of mRNA levels between decapitated and nondecapitated plants of *BRC1*, *BRC2*, and *DRM1*, as analyzed by real-time PCR. Error bars represent the SE from four biological replicate experiments.



1964; Hall and Hillman, 1975; Napoli et al., 1999; Beveridge et al., 2000; Cline, 2000; Tatematsu et al., 2005). In *Arabidopsis*, when the main shoot was removed, one axillary bud elongated prematurely. By contrast, no significant effect of decapitation was detected in *brc1* mutants (Figure 7C). To analyze whether this response correlated with a downregulation of *BRC* genes, *BRC* mRNA levels were analyzed soon after decapitation, before any visible sign of bud outgrowth (Figure 7D). *BRC1* was downregulated significantly in decapitated plants at 1 h after decapitation, reached a minimum at 6 h, and only approached predecapitation levels at 48 h. Downregulation of *DRM1*, an early marker for bud dormancy (Stafstrom et al., 1998; Tatematsu et al., 2005), was delayed with respect to *BRC1* and reached its minimum levels at 24 h after decapitation. *BRC2* was downregulated at 1 h after decapitation but recovered quickly, and at 24 h it was upregulated, possibly as a result of the reduced *BRC1* function (see above). These results suggest that *BRC1* downregulation is an early response to the bud release from apical dominance and is necessary for bud activation.

Together, these results indicate that *BRC1* is transcriptionally regulated by environmental (planting density) and endogenous (apical dominance) stimuli controlling bud dormancy and that this regulation is necessary for the bud response to these signals.

## DISCUSSION

We have shown that *BRC1* acts inside developing buds to promote growth arrest. *BRC1* upregulation (i.e., at high planting density) leads to an increase in branch suppression, and *BRC1* negative regulation causes bud outgrowth. Moreover, environmental and developmental stimuli can modulate *BRC1* transcription, and *BRC1* function is necessary for the proper response to these stimuli. This indicates that *BRC1* represents a key point at which signals controlling branching are integrated within axillary buds (Figure 8), allowing plants to tailor their degree of

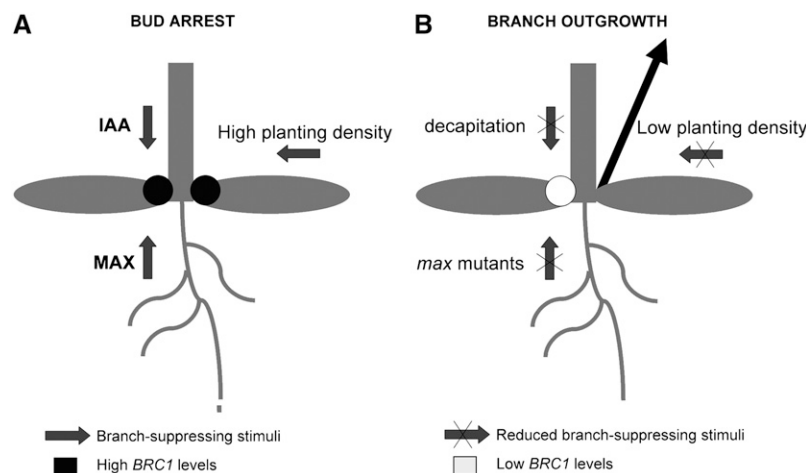
shoot outgrowth to changing conditions. *BRC2*, a closely related gene, seems to play a minor role in this process.

### *BRC1* Promotes Bud Development Arrest

*BRC1* is expressed throughout axillary bud development in different regions of the bud, where it seems to promote growth arrest. Downregulation of *BRC1* leads to a relief of repression that allows the buds to continue their development and generate a branch. *BRC1* may act (downstream of *LAS* and *IFL1*) to antagonize meristem organization or activity (i.e., maintenance of the stem cell niche, cell division, and lateral organ initiation) as the loss of *brc1* function accelerates AM initiation and leads to ectopic AM formation. This would be consistent with the observed downregulation of *BRC1* at the meristem dome before leaf initiation. *BRC1* also controls early stages of bud leaf development, a function reminiscent of that of *CIN*-like genes closely related to *BRC1* (Nath et al., 2003; Palatnik et al., 2003; Crawford et al., 2004). The late expression of *BRC* genes in the provascular tissue underlying mature buds may be necessary to prevent rosette branch outgrowth. This expression may arrest vascular tissue development, isolate buds from shoot growth-promoting signals, or prevent auxin export from the bud. *BRC1* downregulation leads to a relief of growth repression and to lateral shoot outgrowth.

### *BRC1* Function and Hormone Signaling

Shoot branching is inhibited by hormonal signals that move through the plant. Auxin, moving down the plant in the main stem, and a MAX-dependent carotenoid hormone, moving up the plant, prevent bud outgrowth. Auxin is thought to prevent branching by reducing cytokinin synthesis and import into the bud through an *AXR1*-dependent pathway (Sachs and Thimann, 1967; Li et al., 1995; Chatfield et al., 2000; Leyser, 2003; Nordstrom et al., 2004; Tanaka et al., 2006). Our results suggest



**Figure 8.** Scheme of *BRC1* Function in the Control of Bud Outgrowth.

Under adverse conditions, branch-suppressing signals are transduced into the bud, resulting in the upregulation of *BRC1* and bud arrest (A). In the absence of these signals, *BRC1* is downregulated and shoots grow out (B). IAA, indole-3-acetic acid.

that *BRC1* is independent of this pathway, as high auxin levels (*ycc1* mutations), *axr1* mutations, or high cytokinin levels (*amp1* mutations) do not affect *BRC1* transcription. Still, we cannot rule out the possibility that this pathway affects *BRC1* protein stability. On the other hand, *BRC1* is strongly downregulated in *max* mutants, suggesting that *BRC1* may be downstream of the *MAX* signaling pathway. It has been proposed that the *MAX*-dependent hormone controls shoot branching through a mechanism independent of *AXR1*-mediated auxin signaling, by limiting auxin transport in the main stem (Bennett et al., 2006). As this carotenoid-derived compound acts (is required and sufficient) outside the buds (Turnbull et al., 2002), its control of *BRC1* transcription must be indirect. The direct transcriptional regulators of *BRC1* remain to be identified.

### ***BRC1* Is an Integrator of Signals Controlling Bud Growth Arrest**

*BRC1* (and to a lesser extent *BRC2*) is, to date, the only gene described in *Arabidopsis* that functions locally within the bud to prevent bud outgrowth and whose downregulation is necessary to allow branches to develop. The central role of *BRC1* in this process raised the possibility that this gene could integrate different pathways controlling branching. Our results confirm that *BRC1* is transcriptionally controlled by both endogenous (apical dominance) and environmental (planting density) stimuli affecting bud dormancy and that *BRC1* function is necessary for proper bud response to both stimuli. Moreover, in the case of decapitation, we have shown that those changes occur very fast (<1 h after decapitation), earlier than changes in markers of bud dormancy such as *DRM1*. This indicates that *BRC1* is an integrator of signaling pathways controlling bud dormancy.

This mechanism of branching control, in which external and internal inputs perceived in different regions of the plant are transduced into the axils of leaves and are translated into local changes of *BRC1* activity, is reminiscent of another key developmental process, the flowering transition (Ausin et al., 2005). During the control of flowering, several genetic pathways, mediated by signals transported through the plant, converge in the activation (transcriptional or posttranslational, respectively) of the integrator genes *SOC1* and *FT* at the shoot apex (Blazquez, 2005; Parcy, 2005), which in turn set off the developmental program of flower initiation. In the case of branching, the integrating response, the promotion/relief of cell proliferation arrest, would depend on the activity of *BRC1*, controlled by the *MAX* signaling pathway.

### **Conservation of *tb1/BRC* Function among Angiosperms**

*BRC1* is closely related to the maize gene *tb1* in sequence (Howarth and Donoghue, 2006), expression patterns, and mutant phenotypes. However, similarities between *tb1* and *BRC1* are not limited to their shared role in preventing branch outgrowth. *tb1*, like *BRC1*, is expressed in axillary buds as early as AM initiation. It is also expressed in developing husk leaves (the structures homologous with axillary bud leaves), where it suppresses husk leaf blade growth (*tb1* mutants have very long husk leaves) (Hubbard et al., 2002). This function resembles that of

*CIN*-like genes that control leaf shape and leaf growth patterns (Nath et al., 2003; Palatnik et al., 2003; Crawford et al., 2004). This similarity may reflect the common evolutionary origin of class II genes and a conservation of regulatory elements and functions. On the other hand, neither *tb1* nor *BRC1* affects branch node number, and neither is transcribed in the main SAM. However, some differences are also evident. Unlike *BRC1*, *tb1* controls branch internode elongation and seems to have a role during maize inflorescence and flower development, functions for which we have not found equivalents in *BRC1*.

Conservation among species has already been described for other genes involved in branching. AM initiation is controlled by *Ls/LAS/MONOCULM1* (Schumacher et al., 1999; Greb et al., 2003; Li et al., 2003) and *Blind/RAX1* (Schmitz et al., 2002; Keller et al., 2006; Muller et al., 2006) in tomato (*Solanum lycopersicum*), *Arabidopsis*, and rice. Bud outgrowth is controlled by *MAX2/RMS4/D3* (Stirnberg et al., 2002; Ishikawa et al., 2005; Johnson et al., 2006), *MAX3/RMS5/HTD1* (Booker et al., 2004; Beveridge, 2006; Johnson et al., 2006; Zou et al., 2006), and *MAX4/RMS1/DAD1* (Sorefan et al., 2003; Snowden et al., 2005) in *Arabidopsis*, pea (*Pisum sativum*), petunia (*Petunia hybrida*), and rice. The newly found functional conservation of *tb1/BRC* function between monocots and dicots suggests that the control of axillary bud development, from long-distance signaling to local responses during AM initiation, bud development, bud dormancy, and branch outgrowth, may be controlled by a conserved set of genetic functions throughout angiosperms that may correspond to an ancestral developmental pathway evolved before the radiation of flowering plants. Modulation of the process may be divergent in different species, as revealed by the differential regulation of *MAX*-like genes in pea, *Arabidopsis*, and rice (Beveridge, 2006; Johnson et al., 2006). It remains to be studied whether this conservation extends to more distantly related plant groups.

## **METHODS**

### **Plant Material**

Mutant lines of *Arabidopsis thaliana*, in the Columbia background, were backcrossed twice to wild-type Columbia (*brc1-1*, *brc1-2*, *brc1-5*, and *brc2-1*) or three times (*brc1-3* and *brc1-4*). To confirm the site of T-DNA insertion, genomic DNA of *brc1-1*, *brc1-2*, *brc1-5*, and *brc2-1* was PCR-amplified with primers AB, CD, EF, and GH, respectively (see Supplemental Table 5 online), and the PCR products were sequenced.

### **Phenotypic Analysis**

*Arabidopsis* seeds were sown on commercial soil and cold-treated (4°C) for 3 d. Then, they were transferred to a growth room at 20°C with a 16-h photoperiod (long days) or an 8-h photoperiod (short days). Branches (shoots > 0.5 cm) were counted 3 weeks after the time when the main inflorescence was visible, except for in the decapitation assay, in which branches were counted at 10 d after decapitation. For the early phenotype analysis, Pro<sub>CLV3</sub>:*GUS* and *brc1-2* Pro<sub>CLV3</sub>:*GUS* plants were grown for 14 or 25 d. Fourteen days after germination, 10 plants for each genotype were GUS-stained according to Sessions et al. (1999). Twenty-five days after germination, 10 individuals of each genotype were dissected and the developmental stage of each axillary bud was determined with a stereoscopic microscope. Stages were defined as empty axil: no visible meristem; meristem: meristem with no visible leaf primordia, ~100 μm

(Figure 2A); leaf primordium: incipient first two leaf primordia, bud of  $\sim 100\ \mu\text{m}$ ; vegetative 1: buds with two or more leaf primordia formed, no trichomes, 150 to 250  $\mu\text{m}$  (Figure 2B); vegetative 2: mid vegetative stage, buds with differentiating trichome-bearing leaf primordia,  $<400\ \mu\text{m}$  (Figure 5B); vegetative 3: late vegetative stage, buds with expanding trichome-bearing leaf primordia,  $>400\ \mu\text{m}$  (Figure 5C); and reproductive: flower meristems visible within the bud (Figure 2C).

### Phylogenetic Analysis and Sequence Alignment

The predicted amino acid sequences of the TCP and R domains were aligned with ClustalW (Chenna et al., 2003) using the default parameters (Protein Gap Open Penalty = 10.0, Protein Gap Extension Penalty = 0.2, Protein Matrix = Gonnet Protein/DNA, ENDGAP = -1, Protein/DNA GAPDIST = 4) and represented with Genedoc (Nicholas et al., 1997). One thousand bootstrapped data sets were obtained with SEQBOOT, distance matrices were calculated with PROTDIST (Dayhoff PAM matrix algorithm), trees were constructed with NEIGHBOR, and a consensus tree was obtained with CONSENSE. SEQBOOT, PROTDIST, NEIGHBOR, and CONSENSE are from the PHYLIP package (Felsenstein, 1988). Branches with support of  $\geq 70\%$  are indicated.

### cDNA Isolation

RNA from dissected flowering rosettes comprising axillary buds but not rosette leaves was obtained with TRIzol (Invitrogen). cDNAs of *BRC1* and *BRC2* were isolated using the BD SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech) according to the manufacturer's instructions. For 5' rapid amplification of cDNA ends (RACE), PCR was performed with a primer anchored to the modified 5' end and the nested gene-specific primers BRC1-A and BRC1-B for *BRC1* and BRC2-A and BRC2-B for *BRC2* (see Supplemental Table 5 online). For 3' RACE, the PCR was performed with a primer anchored to the 3' end and the gene-specific primers BRC1-C and BRC1-D and BRC2-C and BRC2-D, respectively (see Supplemental Table 5 online). Products from two independent experiments were cloned in pGEM-T Easy vector (Promega) and sequenced.

### Real-Time PCR

Plant tissue was harvested and RNA was isolated with TRIzol (Invitrogen). Traces of DNA were eliminated with TURBO DNA-free (Ambion). Five micrograms of RNA was used to make cDNA with the High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems). Quantitative PCR was performed with FastStart TaqMan Probe Master-Rox (Roche) probes of the Universal ProbeLibrary Set-*Arabidopsis* (Roche) and the Applied Biosystems 7300 real-time PCR system, according to the manufacturer's instructions. The following pairs of primers were used (see Supplemental Table 5 online): for *BRC1*, RT-PCR-BRC1-A/RT-PCR-BRC1-B; for *BRC2*, RT-PCR-BRC2-A/RT-PCR-BRC2-B; for *ACTIN8*, RT-PCR-actin-A/RT-PCR-actin-B; for *DRM1* (At1g28330), DRM1-L/DRM1-R. Three biological replicates were analyzed in each case.  $C_T$  values were obtained with the 7300 Systems SDS software version 1.3 (Applied Biosystems). Relative fold expression changes were calculated by the comparative  $C_T$  method: fold change is calculated as  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . The  $\Delta C_T$  values were calculated as the difference between the  $C_T$  value and the  $C_T$  value of *ACTIN8*.  $\Delta\Delta C_T$  was the difference between  $\Delta C_T$  and the  $C_T$  value of the calibrator. In Figure 1E, the calibrator is the leaf sample; in Figures 6A and 6B, the calibrator is wild-type levels; in Figure 7B, density = 1; and in Figure 7D, time = 0.

### Planting Density Test

Wild-type Columbia and *brc1-2* plants were grown under long days at low density (one plant per pot) or high density (nine plants per pot). Five

rosettes of each genotype were dissected when bolts were 1 cm long. RNA was extracted, and real-time PCR was performed as described. The experiment was repeated three times.

### Apical Dominance Test

Wild-type Columbia and *brc1-2* plants were grown under long days. When the main inflorescence began to bolt ( $<0.5\ \text{cm}$ ), plants were labeled. Four days later, in half of them, the main shoot, including the cauline nodes, was removed. Seven to 10 decapitated and nondecapitated rosettes were collected at  $T_0 = 0\ \text{h}$ ,  $T_1 = 1\ \text{h}$ ,  $T_2 = 6\ \text{h}$ ,  $T_3 = 24\ \text{h}$ , and  $T_5 = 48\ \text{h}$ . RNA was extracted as described, and real-time PCR was performed. The experiment was repeated four times.

### ProCaMV35S:RNAi Constructs

*BRC1*- and *BRC2*-specific PCR products (645 and 499 bp, respectively) were cloned into the binary vector pFGC1008 (<http://www.chromdb.org>) using restriction sites *AscI*/*SwaI* and *BamHI*/*SpeI* for the first and second cloning, respectively. Primers TCP18S5'/TCP18S3' were used for *BRC1* and TCP12S5'/TCP12S3' were used for *BRC2* (see Supplemental Table 5 online).

### ProCaMV35S:GFP:BRC Constructs

The cDNAs of *BRC1* and *BRC2*, cloned in pGEM, were amplified using Pwo polymerase (Roche) with primers 18B1/18B2 (see Supplemental Table 5 online). The PCR fragment was BP cloned into the entry vector pDONR207 (Gateway, Invitrogen) and then LR cloned into the destination vector pGWB6 (from Tsuyoshi Nakagawa, Shimane University).

### Arabidopsis Transgenic Plants

Transgenic plants (Columbia ecotype) were generated by agroinfiltration using the floral dip method (Clough and Bent, 1998). T3 homozygous lines generated from T1 individuals carrying a single insertion of the transgene were analyzed.

### In Situ Hybridization

Digoxigenin labeling of RNA probes, tissue preparation, and hybridization were performed as described by Calonje et al. (2004). The templates for *BRC1* and *BRC2* digoxigenin-labeled probes were 1.2- and 1-kb linearized fragments containing the complete coding regions. The hybridized sections were visualized with Nomarski optics in a DMR microscope (Leica).

### Scanning Electron Microscopy

Rosettes were dissected and prepared for scanning electron microscopy analysis as described by Carmona et al. (2002).

### Accession Numbers

The GenBank accession numbers for *BRC1* cDNA and *BRC2* cDNA are AM408560 and AM408561, respectively. Accession numbers for the complete *Arabidopsis* TCP gene family are given in Supplemental Table 1 online.

### Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

**Supplemental Table 1.** *Arabidopsis* Genome Initiative Numbers for the Complete *Arabidopsis* TCP Gene Family.

**Supplemental Table 2.** Mutant Alleles and RNAi Lines Used in This Work.

**Supplemental Table 3.** Shoot Branching Phenotypes of *brc* Mutants.

**Supplemental Table 4.** Shoot Branching Phenotypes of Double Mutants with *brc1*.

**Supplemental Table 5.** Oligonucleotides Cited in Methods.

**Supplemental Figure 1.** Alignment of the TCP Domain for the Predicted *Arabidopsis* TCP Proteins.

**Supplemental Figure 2.** Shoot Branching Phenotypes of *ycc1*, *ycc1 brc1-1*, and *brc1-1* Mutants.

**Supplemental Figure 3.** Phenotype of Pro<sub>CaMV35S</sub>:*GFP:BRC1* Plants.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank E. Coen, O. Leyser, D. Bradley, J.M. Martínez-Zapater, S. Prat, M. Martín, and M. Rodríguez for helpful comments on the manuscript; R. Piqueras and M. Peinado for technical assistance; M. Rodríguez, E. Jiménez, and C. Manzano for help with the phenotypic analysis; J.M. Martínez-Zapater for support during early stages of this work; R. Simon, A. Caño, Z.H. Ye, K. Theres, O. Leyser, and J.M. Franco-Zorrilla for seed stocks; and T. Nakagawa for Gateway vectors. This work was supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Grant BIO2002-00384) and the Ministerio de Educación y Ciencia (Grant BIO2005-00570). J.A.A.-M. is a predoctoral fellow of the Ministerio de Ciencia y Tecnología. C.P.-C. was supported in part by the Comunidad de Madrid (Grant GR/SAL/0658/2004) and in part by the Ministerio de Educación y Ciencia (Grant BIO2005-00570).

Received November 15, 2006; revised January 16, 2007; accepted January 28, 2007; published February 16, 2007.

## REFERENCES

- Alonso, J.M., et al. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653–657.
- Ausin, I., Alonso-Blanco, C., and Martínez-Zapater, J.M. (2005). Environmental regulation of flowering. *Int. J. Dev. Biol.* **49**: 689–705.
- Bennett, T., Sieberer, T., Willett, B., Booker, J., Luschnig, C., and Leyser, O. (2006). The *Arabidopsis* MAX pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Curr. Biol.* **16**: 553–563.
- Beveridge, C.A. (2006). Axillary bud outgrowth: Sending a message. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**: 35–40.
- Beveridge, C.A., Symons, G.M., and Turnbull, C.G.N. (2000). Auxin inhibition of decapitation-induced branching is dependent on graft-transmissible signals regulated by genes *Rms1* and *Rms2*. *Plant Physiol.* **123**: 689–698.
- Blazquez, M.A. (2005). Plant science. The right time and place for making flowers. *Science* **309**: 1024–1025.
- Booker, J., Auldridge, M., Wills, S., McCarty, D., Klee, H., and Leyser, O. (2004). MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr. Biol.* **14**: 1232–1238.
- Booker, J., Sieberer, T., Wright, W., Williamson, L., Willett, B., Stirnberg, P., Turnbull, C., Srinivasan, M., Goddard, P., and Leyser, O. (2005). MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Dev. Cell* **8**: 443–449.
- Brand, U., Grunewald, M., Hobe, M., and Simon, R. (2002). Regulation of CLV3 expression by two homeobox genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **129**: 565–575.
- Calonje, M., Cubas, P., Carmona, M.J., and Martínez-Zapater, J.M. (2004). Floral meristem identity genes are expressed during tendril development in grapevine. *Plant Physiol.* **135**: 1491–1501.
- Carmona, M.J., Cubas, P., and Martínez-Zapater, J.M. (2002). VFL, the grapevine FLORICAULA/LEAFY ortholog, is expressed in meristematic regions independently of their fate. *Plant Physiol.* **130**: 68–77.
- Casal, J.J., Sánchez, R.A., and Deregibus, V.A. (1986). The effect of plant density on tillering: The involvement of red/far red ratio and the proportion of radiation intercepted per plant. *Environ. Exp. Bot.* **26**: 365–371.
- Chatfield, S.P., Stirnberg, P., Forde, B.G., and Leyser, O. (2000). The hormonal regulation of axillary bud growth in *Arabidopsis*. *Plant J.* **24**: 159–169.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G., and Thompson, J.D. (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* **31**: 3497–3500.
- Cline, M.G. (1991). Apical dominance. *Bot. Rev.* **57**: 318–358.
- Cline, M.G. (1997). Concepts and terminology of apical dominance. *Am. J. Bot.* **84**: 1064–1069.
- Cline, M.G. (2000). Execution of the auxin replacement apical dominance experiment in temperate woody species. *Am. J. Bot.* **87**: 182–190.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735–743.
- Crawford, B.C.W., Nath, U., Carpenter, R., and Coen, E.S. (2004). CINCINNATA controls both cell differentiation and growth in petal lobes and leaves of *Antirrhinum*. *Plant Physiol.* **135**: 244–253.
- Cubas, P. (2002). Role of TCP genes in the evolution of key morphological characters in angiosperms. In *Developmental Genetics and Plant Evolution*, Q. Cronk, J. Hawkins, and R.M. Bateman, eds (London: Taylor and Francis), pp. 247–266.
- Cubas, P., Coen, E., and Zapater, J. (2001). Ancient asymmetries in the evolution of flowers. *Curr. Biol.* **11**: 1050–1052.
- Cubas, P., Lauter, N., Doebley, J., and Coen, E. (1999). The TCP domain: A motif found in proteins regulating plant growth and development. *Plant J.* **18**: 215–222.
- Doebley, J., Stec, A., and Hubbard, L. (1997). The evolution of apical dominance in maize. *Nature* **386**: 485–488.
- Dun, E.A., Ferguson, B.J., and Beveridge, C.A. (2006). Apical dominance and shoot branching. Divergent opinions or divergent mechanisms? *Plant Physiol.* **142**: 812–819.
- Felsenstein, J. (1989). PHYLIP—Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**: 164–166.
- Grbic, V., and Bleecker, A.B. (2000). Axillary meristem development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **21**: 215–223.
- Greb, T., Clarenz, O., Schafer, E., Muller, D., Herrero, R., Schmitz, G., and Theres, K. (2003). Molecular analysis of the LATERAL SUPPRESSOR gene in *Arabidopsis* reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation. *Genes Dev.* **17**: 1175–1187.
- Hall, S.M., and Hillman, J.R. (1975). Correlative inhibition of lateral bud growth in *Phaseolus vulgaris* L timing of bud growth following decapitation. *Planta* **123**: 137–143.
- Helliwell, C., Chin-Atkins, A., Wilson, I., Chapple, R., Dennis, E., and Chaudhury, A. (2001). The *Arabidopsis* AMP1 gene encodes a putative glutamate carboxypeptidase. *Plant Cell* **13**: 2115–2126.
- Hempel, F.D., and Feldman, L.J. (1994). Bidirectional inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*—Acropetal initiation of flowers and basipetal initiation of paraclades. *Planta* **192**: 276–286.

- Horvath, D.P., Anderson, J.V., Chao, W.S., and Foley, M.E. (2003). Knowing when to grow: Signals regulating bud dormancy. *Trends Plant Sci.* **8**: 534–540.
- Howarth, D.G., and Donoghue, M.J. (2006). Phylogenetic analysis of the “ECE” (CYC/TB1) clade reveals duplications predating the core eudicots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 9101–9106.
- Hu, W., Zhang, S., Zhao, Z., Sun, C., Zhao, Y., and Luo, D. (2003). The analysis of the structure and expression of Os *TB1* gene in rice. *J. Plant Physiol. Mol. Biol.* **29**: 507–514.
- Hubbard, L., McSteen, P., Doebley, J., and Hake, S. (2002). Expression patterns and mutant phenotype of teosinte branched1 correlate with growth suppression in maize and teosinte. *Genetics* **162**: 1927–1935.
- Huntley, R.P., and Murray, J.A. (1999). The plant cell cycle. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 440–446.
- Ishikawa, S., Maekawa, M., Arite, T., Onishi, K., Takamure, I., and Kyozuka, J. (2005). Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant Cell Physiol.* **46**: 79–86.
- Johnson, X., Bricch, T., Dun, E.A., Goussot, M., Haurogne, K., Beveridge, C.A., and Rameau, C. (2006). Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are co-regulated by other long-distance signals. *Plant Physiol.* **142**: 1014–1026.
- Kebrom, T.H., Burson, B.L., and Finlayson, S.A. (2006). Phytochrome B represses teosinte branched1 expression and induces sorghum axillary bud outgrowth in response to light signals. *Plant Physiol.* **140**: 1109–1117.
- Keller, T., Abbott, J., Moritz, T., and Doerner, P. (2006). *Arabidopsis* REGULATOR OF AXILLARY MERISTEMS1 controls a leaf axil stem cell niche and modulates vegetative development. *Plant Cell* **18**: 598–611.
- Kosugi, S., and Ohashi, Y. (1997). PCF1 and PCF2 specifically bind to cis elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene. *Plant Cell* **9**: 1607–1619.
- Kosugi, S., and Ohashi, Y. (2002). DNA binding and dimerization specificity and potential targets for the TCP protein family. *Plant J.* **30**: 337–348.
- Lang, G.A., Early, J.D., Martin, G.C., and Darnell, R.L. (1987). Endo-, para- and eco-dormancy: Physiological terminology and classification for dormancy research. *Hortic. Sci.* **22**: 371–377.
- Leyser, O. (2003). Regulation of shoot branching by auxin. *Trends Plant Sci.* **8**: 541–545.
- Li, C.J., Guevara, E., Herrera, J., and Bangerth, F. (1995). Effect of apex excision and replacement by 1-naphthylacetic acid on cytokinin concentration and apical dominance in pea plants. *Physiol. Plant.* **94**: 465–469.
- Li, X., et al. (2003). Control of tillering in rice. *Nature* **422**: 618–621.
- Long, J., and Barton, M.K. (2000). Initiation of axillary and floral meristems in *Arabidopsis*. *Dev. Biol.* **218**: 341–353.
- Luo, D., Carpenter, R., Copsey, L., Vincent, C., Clark, J., and Coen, E. (1999). Control of organ asymmetry in flowers of *Antirrhinum*. *Cell* **99**: 367–376.
- Luo, D., Carpenter, R., Vincent, C., Copsey, L., and Coen, E. (1996). Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum*. *Nature* **383**: 794–799.
- Morris, D.A. (1977). Transport of exogenous auxin in two-branched dwarf pea seedlings (*Pisum sativum* L.): Some implications for polarity and apical dominance. *Planta* **136**: 91–96.
- Muller, D., Schmitz, G., and Theres, K. (2006). Blind homologous R2R3 Myb genes control the pattern of lateral meristem initiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 586–597.
- Napoli, C.A., Beveridge, C.A., and Snowden, K.C. (1999). Reevaluating concepts of apical dominance and the control of axillary bud outgrowth. *Curr. Top. Dev. Biol.* **44**: 127–169.
- Nath, U., Crawford, B., Carpenter, R., and Coen, E. (2003). Genetic control of surface curvature. *Science* **299**: 1404–1407.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B.J., and Deerfield, D.W. (1997). GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW News* **4**: 14.
- Nordstrom, A., Tarkowski, P., Tarkowska, D., Norbaek, R., Astot, C., Dolezal, K., and Sandberg, G. (2004). Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: A factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 8039–8044.
- Otsuga, D., DeGuzman, B., Prigge, M.J., Drews, G.N., and Clark, S.E. (2001). REVOLUTA regulates meristem initiation at lateral positions. *Plant J.* **25**: 223–236.
- Palatnik, J., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J., and Weigel, D. (2003). Control of leaf morphogenesis by micro-RNAs. *Nature* **425**: 257–263.
- Parcy, F. (2005). Flowering: A time for integration. *Int. J. Dev. Biol.* **49**: 585–593.
- Peng, M., Cui, Y., Bi, Y.-M., and Rothstein, S.J. (2006). AtMBD9: A protein with a methyl-CpG-binding domain regulates flowering time and shoot branching in *Arabidopsis*. *Plant J.* **46**: 282–296.
- Qin, L., Guo, X., Feng, X., Weng, L., Yan, J., Hu, X., and Luo, D. (2004). Cloning of LjCYC1 gene and nuclear localization of LjCYC1 protein in *Lotus japonicus*. *J. Plant Physiol. Mol. Biol.* **30**: 523–532.
- Ratcliffe, O.J., Riechmann, J.L., and Zhang, J.Z. (2000). INTERFASCICULAR FIBERLESS1 is the same gene as REVOLUTA. *Plant Cell* **12**: 315–317.
- Rosso, M.G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K., and Weisshaar, B. (2003). An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol. Biol.* **53**: 247–259.
- Sachs, T., and Thimann, K.V. (1964). Release of lateral buds from apical dominance. *Nature* **201**: 939–940.
- Sachs, T., and Thimann, K.V. (1967). The role of auxins and cytokinins in the release of buds from dominance. *Am. J. Bot.* **54**: 136–144.
- Schmitz, G., and Theres, K. (2005). Shoot and inflorescence branching. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 506–511.
- Schmitz, G., Tillmann, E., Carriero, F., Fiore, C., Cellini, F., and Theres, K. (2002). The tomato Blind gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation of lateral meristems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 1064–1069.
- Schumacher, K., Schmitt, T., Rossberg, M., Schmitz, G., and Theres, K. (1999). The Lateral suppressor (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHLID protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 290–295.
- Sessions, A., Weigel, D., and Yanofsky, M.F. (1999). The *Arabidopsis thaliana* MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *Plant J.* **20**: 259–263.
- Shimizu-Sato, S., and Mori, H. (2001). Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. *Plant Physiol.* **127**: 1405–1413.
- Snowden, K.C., Simkin, A.J., Janssen, B.J., Templeton, K.R., Loucas, H.M., Simons, J.L., Karunairetnam, S., Gleave, A.P., Clark, D.G., and Klee, H.J. (2005). The Decreased apical dominance1/*Petunia hybrida* CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *Plant Cell* **17**: 746–759.
- Sorefan, E., Booker, J., Haurogne, K., Goussot, M., Bainbridge, K., Foo, E., Chatfield, S., Ward, S., Beveridge, C., Rameau, C., and Leyser, O. (2003). MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea. *Genes Dev.* **17**: 1469–1474.
- Stafstrom, J.P., Ripley, B.D., Devitt, M.L., and Drake, B. (1998). Dormancy-associated gene expression in pea axillary buds. Cloning and expression of PsDRM1 and PsDRM2. *Planta* **205**: 547–552.
- Stirnberg, P., van De Sande, K., and Leyser, H.M. (2002). MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development* **129**: 1131–1141.

- Suzuki, T., Sakurai, K., Ueguchi, C., and Mizuno, T.** (2001). Two types of putative nuclear factors that physically interact with histidine-containing phosphotransfer (Hpt) domains, signaling mediators in His-to-Asp phosphorelay, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **42**: 37–45.
- Takeda, T., Suwa, Y., Suzuki, M., Kitano, H., Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Matsuoka, M., and Ueguchi, C.** (2003). The Os *TB1* gene negatively regulates lateral branching in rice. *Plant J.* **33**: 513–520.
- Talbert, P.B., Adler, H.T., Parks, D.W., and Comai, L.** (1995). The REVOLUTA gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **121**: 2723–2735.
- Tanaka, M., Takei, K., Kojima, M., Sakakibara, H., and Mori, H.** (2006). Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant J.* **45**: 1028–1036.
- Tatematsu, K., Ward, S., Leyser, O., Kamiya, Y., and Nambara, E.** (2005). Identification of cis-elements that regulate gene expression during initiation of axillary bud outgrowth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **138**: 757–766.
- Till, B.J., et al.** (2003). Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Res.* **13**: 524–530.
- Turnbull, C., Raymond, M., Dodd, I., and Morris, S.** (1997). Rapid increases in cytokinin concentration in lateral buds of chickpea (*Cicer arietinum* L.) during release of apical dominance. *Planta* **202**: 271–276.
- Turnbull, C.G., Booker, J.P., and Leyser, H.M.** (2002). Micrografting techniques for testing long-distance signalling in *Arabidopsis*. *Plant J.* **32**: 255–262.
- Wang, R., Stec, A., Hey, J., Lukens, L., and Doebley, J.** (1999). The limits of selection during maize domestication. *Nature* **398**: 236–239.
- Zhao, Y., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Cashman, J.R., Cohen, J.D., Weigel, D., and Chory, J.** (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* **291**: 306–309.
- Zhong, R., and Ye, Z.H.** (2001). Alteration of auxin polar transport in the *Arabidopsis* *ifl1* mutants. *Plant Physiol.* **126**: 549–563.
- Zou, J., Zhang, S., Zhang, W., Li, G., Chen, Z., Zhai, W., Zhao, X., Pan, X., Xie, Q., and Zhu, L.** (2006). The rice HIGH-TILLERING DWARF1 encoding an ortholog of *Arabidopsis* MAX3 is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds. *Plant J.* **48**: 687–698.